

Université de Montréal

**Modifications post-traductionnelles  
des canaux calciques cardiaques de type L :  
identification des résidus asparagine qui participent à  
la glycosylation de la sous-unité auxiliaire  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$**

par

Marie-Philippe Tétreault

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences  
en physiologie  
option physiologie et biophysique moléculaires

Décembre 2015

© Marie-Philippe Tétreault, 2015

Université de Montréal Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Modifications post-traductionnelles  
des canaux calciques cardiaques de type L :  
identification des résidus asparagine qui participent à  
la glycosylation de la sous-unité auxiliaire  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$

Présenté par :

Marie-Philippe Tétreault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Rémy Sauvé, président rapporteur

Dr Lucie Parent, directrice de recherche

Dr Angelo Calderone, membre du jury



## Résumé

Les canaux calciques de type L  $\text{Ca}_v1.2$  sont principalement responsables de l'entrée des ions calcium pendant la phase plateau du potentiel d'action des cardiomyocytes ventriculaires. Cet influx calcique est requis pour initier la contraction du muscle cardiaque. Le canal  $\text{Ca}_v1.2$  est un complexe oligomérique qui est composé de la sous-unité principale  $\text{Ca}_v\alpha1$  et des sous-unités auxiliaires  $\text{Ca}_v\beta$  et  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ .  $\text{Ca}_v\beta$  joue un rôle déterminant dans l'adressage membranaire de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha1$ .  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  stabilise l'état ouvert du canal mais le mécanisme moléculaire responsable de cette modulation n'a pas été encore identifié. Nous avons récemment montré que cette modulation requiert une expression membranaire significative de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  (Bourdin et al. 2015).  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  est une glycoprotéine qui possède 16 sites potentiels de glycosylation de type N. Nous avons donc évalué le rôle de la glycosylation de type-N dans l'adressage membranaire et la stabilité de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . Nous avons d'abord confirmé que la protéine  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  recombinante, telle la protéine endogène, est significativement glycosylée puisque le traitement à la PNGase F se traduit par une diminution de 50 kDa de sa masse moléculaire, ce qui est compatible avec la présence de 16 sites Asn. Il s'est avéré par ailleurs que la mutation simultanée de 6/16 sites (6xNQ) est suffisante pour 1) réduire significativement la densité de surface de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  telle que mesurée par cytométrie en flux et par imagerie confocale 2) accélérer les cinétiques de dégradation telle qu'estimée après arrêt de la synthèse protéique et 3) diminuer la modulation fonctionnelle des courants générés par  $\text{Ca}_v1.2$  telle qu'évaluée par la méthode du « patch-clamp ». Les effets les plus importants ont toutefois été obtenus avec les mutants N663Q, et les doubles mutants N348Q/N468Q, N348Q/N812Q, N468Q/N812Q. Ensemble, ces résultats montrent que Asn663 et à un moindre degré Asn348, Asn468 et Asn812 contribuent à la biogenèse et la stabilité de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  et confirment que la glycosylation de type N de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  est nécessaire à la fonction du canal calcique cardiaque de type L.

Mots clés : Canaux calciques, densité membranaire, «gating», expression recombinante, cardiomyocytes, Électrophysiologie, Cytométrie en flux, imagerie confocale.

## Abstract

L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels play a key role in the excitation-contraction coupling in the heart. They are formed of a pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit in complex with the intracellular  $\text{Ca}_v\beta$  and the disulfur-linked  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  accessory subunits.  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  significantly increases peak current densities of  $\text{Ca}_v1.2$ . The mechanism underlying this effect is still under study but requires that  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  be trafficked at the cell surface.  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  contains 16 putative N-glycosylation sites. A study was carried out to identify the role of N-glycosylation in the trafficking and protein stability of the subunit  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ . Herein we show that enzymatic removal of N-glycans produced a 50 kDa shift in the mobility of cardiac and recombinant  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  proteins. Simultaneous mutation of the 16 Asn sites was required to fully account for this change in protein mobility. Nonetheless, the mutation of only 6/16 sites was sufficient to 1) significantly reduce the steady-state cell surface fluorescence of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  as characterized by two-color flow cytometry assays and confocal imaging; 2) accelerate the degradation kinetics estimated from cycloheximide chase assays; and 3) prevent the  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -mediated increase in peak current density and voltage-dependent gating of  $\text{Ca}_v1.2$ . Reversing the N348Q and N812Q mutations in the non-operational 6 Asn mutant functionally rescued  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . Single mutation N663Q and double mutations N348Q/ N468Q, N348Q/ N812Q, N468Q/N812Q decreased protein stability/synthesis and abolished steady-state cell surface density as well as upregulation of L-type currents. These results demonstrate that Asn663, and to a lesser extent Asn348, Asn468, and Asn812 contribute to the stability of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  function and furthermore that N-glycosylation of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  is essential to produce functional L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

Key words : Calcium channels, cell surface density, gating, recombinant expression, cardiomyocytes, electrophysiology, flow cytometry, confocal imaging.

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUCTION .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.1 Rôles physiologiques du <math>\text{Ca}^{2+}</math> .....</b>                              | <b>13</b> |
| 1.1.1 Distribution dans la cellule .....  | 14        |
| 1.1.2 Transport membranaire de l'ion $\text{Ca}^{2+}$ .....                                       | 14        |
| <b>1.2 Canaux calciques activés par le voltage .....</b>  | <b>16</b> |
| 1.2.1 Les canaux HVA .....  | 18        |
| 1.2.2 Canaux calciques de type $\text{Ca}_v1$ .....   | 18        |
| 1.2.3 Rôle physiologique des canaux calciques de type L .....                                     | 20        |
| 1.2.3.1 Couplage excitation-transcription .....   | 20        |
| 1.2.3.2 Couplage excitation-contraction du muscle squelettique .....                              | 22        |
| 1.2.3.3 Couplage excitation-contraction du muscle cardiaque .....                                 | 23        |
| 1.2.3.3.1 Rôle du canal $\text{Ca}_v1.2$ dans la rythmicité cardiaque .....                       | 25        |
| 1.2.4 Canaux calciques neuronaux .....  | 26        |
| 1.2.5 Pathologies associées aux canaux HVA .....  | 27        |
| 1.2.6 Structure quaternaire $\text{Ca}_v1$ .....  | 29        |
| 1.2.6.1 Sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$ .....   | 30        |
| 1.2.6.2 La sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta$ .....   | 32        |
| 1.2.6.3 La sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\gamma$ .....  | 33        |
| 1.2.6.4 La sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ .....                                 | 34        |
| 1.2.6.4.1 Structure .....   | 34        |
| 1.2.6.4.2 Rôle de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ .....                                  | 36        |
| 1.2.6.4.3 Pathologies associées avec $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ .....                             | 37        |
| <b>1.3 Les modifications post-traductionnelles de <math>\text{Ca}_v\alpha2\delta</math> .....</b> | <b>38</b> |
| 1.3.1 La glycosylation .....  | 40        |
| 1.3.1.1 La glycosylation de type N .....  | 42        |
| 1.3.1.2 La glycosylation de type O .....  | 43        |
| 1.3.1.3 L'ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) .....  | 43        |
| <b>1.4 Le système de dégradation des protéines .....</b>  | <b>44</b> |
| 1.4.1 L'autophagie .....  | 44        |
| 1.4.2 L'ubiquitination .....  | 46        |
| <b>1.5 Hypothèses et Objectifs .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>2.1 Technique de biologie moléculaire .....</b>  | <b>49</b> |
| 2.1.2 Insertion du HA .....   | 51        |
| 2.1.3 Mutations de glycosylation de type N .....  | 52        |
| <b>2.2 Culture cellulaire et transfection des cellules .....</b>                                  | <b>52</b> |
| 2.2.1 Culture cellulaire des HEKT .....   | 52        |
| 2.2.2 Transfection .....  | 54        |
| 2.2.3 Traitement à la cycloheximide .....   | 55        |
| 2.2.4 Isolation des cardiomyocytes .....  | 55        |
| <b>2.3 Immunobuvardage de type Western .....</b>  | <b>55</b> |
| 2.3.1 Lysat cellulaire .....  | 55        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.3.2 Traitement à la PNGase et EndoH .....  | 56         |
| 2.3.3 Gel SDS-PAGE .....   | 56         |
| 2.3.4 Transfert .....  | 56         |
| 2.3.5 Immunobuvardage.....   | 57         |
| 2.3.6 Révélation par chimioluminescence .....  | 57         |
| 2.3.7 Isolation de la membrane plasmique des cardiomyocytes et des cellules HEKT ..  | 57         |
| <b>2.4 Cytométrie en flux .....</b>  | <b>58</b>  |
| 2.4.1 Préparation des cellules .....   | 58         |
| 2.4.2 Prise des données .....  | 59         |
| 2.4.3 Analyse des données .....  | 59         |
| <b>2.5 Microscopie confocale .....</b>   | <b>60</b>  |
| 2.5.1 Imagerie des cardiomyocytes .....  | 60         |
| 2.5.2 Imagerie des HEKT .....  | 61         |
| <b>2.6 Électrophysiologie .....</b>  | <b>61</b>  |
| 2.6.1 Enregistrements des données (par Benoîte Bourdin, Behzad Shakeri, Guillaume Roussel et Émilie Segura) .....  | 61         |
| 2.6.2 Analyse des données électrophysiologiques.....   | 62         |
| <b>3 RÉSULTATS (par article) .....</b>   | <b>63</b>  |
| <b>4 DISCUSSION .....</b>  | <b>87</b>  |
| 4.1 $Ca_v\alpha 2\delta 1$ possède 16 sites de glycosylation de type N.....  | 87         |
| 4.2 La mutation N663 prévient la densité de $Ca_v\alpha 2\delta 1$ à la surface de la cellule.....   | 89         |
| 4.3 L'absence de glycosylation diminue la stabilité de $Ca_v\alpha 2\delta 1$ .....  | 90         |
| 4.4 La modulation des canaux de type L .....   | 91         |
| 4.4.1 L'interaction avec la sous-unité par $Ca_v\alpha 2\delta 1$ .....  | 91         |
| 4.4.2 L'interaction par les glycanes de type N.....  | 92         |
| <b>5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>6 BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>7 APPENDICES .....</b>  | <b>119</b> |
| 7.1 Alignement des séquences de $Ca_v\alpha 2\delta 1$ et conservation des sites de glycosylation de type N .....  | 119        |
| 7.2 Article : Identification of Glycosylation Sites Essential for Surface Expression of the $Ca_v\alpha 2\delta 1$ Subunit and Modulation of the Cardiac $Ca_v1.2$ Channel Activity..... | 122        |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 : Classification, nomenclature, localisation tissulaire et propriétés pharmacologiques des canaux calciques activés par le voltage..... | 7  |
| Tableau 2.1: Les différentes sous-unités utilisées.....   | 36 |
| Tableau 2.2. Prédiction des sites de glycosylation de type N de la séquence primaire de Ca <sub>v</sub> α2δ1 du rat .....                         | 40 |

## Liste des tableaux dans l'article

|   |    |
|---|----|
| Table 3.1. Relative fluorescence intensity ΔMFI for mCherry-Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA WT and mutants.....                   | 80 |
| Table 3.2. Biophysical properties of Ca <sub>v</sub> 1.2/Ca <sub>v</sub> β3 with Ca <sub>v</sub> α2δ1 WT and mutants..... | 82 |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1.1. Différents mode de transport à travers la membrane.....   | 3  |
| Figure 1.2 : Arbre phylogénétique des canaux $\text{Ca}_v$ .....  | 8  |
| Figure 1.3. Couplage excitation-transcription.....  | 9  |
| Figure 1.4. Couplage excitation-contraction .....   | 11 |
| Figure 1.5. Potentiel d'action cardiaque.....   | 13 |
| Figure 1.6. Organisation des sous-unités $\alpha 1$ , $\alpha 2$ , $\beta$ , $\gamma$ et $\delta$ des canaux calciques de type L.....                   | 17 |
| Figure 1.7 : Alignement de séquence des segments S4 des canaux VGCC.....  | 19 |
| Figure 1.8: Diagramme de l'organisation schématique des domaines fonctionnels de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ selon la structure cristalline..... | 20 |
| Figure 1.9: Modifications post-traductionnelles proposées de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ .....  | 22 |
| Figure 1.10. Les différents domaines et les sites de glycosylation de type N de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .....                       | 23 |
| Figure 1.11. Synthèse protéique et modifications post-traductionnelles .....  | 28 |
| Figure 1.12. La glycosylation de type N.....  | 29 |
| Figure 1.13. Les deux voies de dégradations des protéines.....  | 32 |
| Figure 2.1. Technique d'assemblage de Gibson.....   | 37 |
| Figure 2.2. Méthodes d'analyse des échantillons en cytométrie en flux.....  | 47 |

## Liste des figures dans l'article

|   |    |
|---|----|
| FIGURE 3.1: Endogenous $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ proteins in mouse cardiomyocytes are glycoproteins.....  | 67 |
| FIGURE 3.2: PNGase F mediated deglycosylation of the N-linked sugars from $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ expressed in HEKT.....  | 68 |
| FIGURE 3.3: Simultaneous mutations of 6 N-glycosylation sites disrupt cell surface expression of $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ and prevent the stimulation of $\text{Ca}_v 1.2$ currents..... | 70 |
| FIGURE 3.4: Reverse mutation Q812N cancels the impact of the 6xNQ mutant on $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .....   | 72 |
| FIGURE 3.5: Single mutations N663Q and N812Q decrease cell surface expression of $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ and modulation of $\text{Ca}_v 1.2$ whole-cell currents.....                   | 73 |
| FIGURE 3.6: Live cell imaging of $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ proteins WT and mutants.....   | 74 |
| FIGURE 3.7: Combining mutations N346Q, N468Q and N812Q eliminate cell surface expression of $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ and modulation of $\text{Ca}_v 1.2$ whole-cell currents.....        | 75 |
| FIGURE 3.8: A total of 16 Asn sites are required to account for N-glycosylation of $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .....  | 76 |
| FIGURE 3.9: Mutiple Asn mutations impair protein stability.....   | 78 |

## Liste des abréviations

### -A-

ADN : Acide désoxyribonucléique

AID : Alpha Interaction Domain

ATP : Adénosine triphosphate

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

### -B-

BTZ : Benzothiazépines

Ba<sup>2+</sup> : Barium

### -C-

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CaM : Calmoduline

CaMKIV : «calmodulin-activated kinase IV»

Ca<sub>v</sub> : Canaux calciques activés par le voltage

CICR : «Ca<sup>2+</sup>-induced-Ca<sup>2+</sup>-release»

CREB : «Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element binding protein»

CRE : « cAMP Response Element »

CDI : «Calcium dependant inactivation»

### -D-

Dol-P-Man : Dolichol phosphate mannose

Dol-P-Glc : Dolichol phosphate glucose

DPH : Dihydropyridine

### -E-

ERAD : «Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation»

ERK1/2 : «Extracellular Signal-regulated Kinase 1 or 2»



**-F-**

Fuc : Fuctose

**-G-**

Gal : Galactose

Glc : Glucose

GlcNAc : Acetylglucosamine

GPI : Glycophosphatidylinositol

GDP-Man : Guanosine diphosphate mannose

GWASs: Genome-wide association study

**-H-**

HVA : High-Voltage-Activated

HypoPP : Paralysie périodique hypokalémique

**-K-**

K<sup>+</sup> : Potassium

K<sub>V</sub> : Canaux potassiques activés par le voltage

KCNE1 : Potassium voltage-gated channel subfamily E member 1

**-L-**

LAMP : Lysosome-associated membrane protein

LVA : Low-Voltage-Activated

**-M-**

Man : Mannose

Man-6-P : Mannose-6-phosphate

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

**-N-**

N (Asn) : Asparagine

Na<sup>+</sup> : Ions sodium

NCX : Échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

Na<sub>v</sub> : Canaux sodiques activés par le voltage

**-P-**

PAA : Phénylalkylamines

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLN : Phospholamban

POMT : Protein-O-mannosyltransferase

**-Q-**

Q (Glu) : Glutamine

**-R-**

RE : Réticulum endoplasmique

RS : Réticulum sarcoplasmique

RSK : «p90 ribosomal S6 kinase»

RyR : Récepteur à la ryanodine

**-S-**

Sr<sup>2+</sup> : strontium

SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide

**-T-**

T<sub>1/2</sub> : Temps de demi-vie

**-U-**

Ub : Ubiquitine

UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acetylglycosamine

**-V-**

VGCC : Canaux calciques activés par le voltage

VWA : Facteur von Willebrand de type A

**-X-**

X : Acide aminé quelconque

*À Normand et Louise*

## Remerciements

Je suis très reconnaissante envers le Dr Lucie Parent de m'avoir tout d'abord accueillie dans son équipe pour trois stages lors de mon baccalauréat et de m'avoir soutenue dans ma candidature pour la maîtrise. Je lui suis très reconnaissante d'avoir cru en moi. Durant les deux années, Dr Parent m'a encadrée, m'a encouragée, m'a enseignée l'intégrité scientifique et a consacré beaucoup de temps à la réalisation de mon article premier auteur. Grâce au Dr Parent, je me suis surpassée et aujourd'hui je suis très fière de mon accomplissement.

Je tiens à remercier mes collègues du laboratoire qui m'ont supportée tout au long de mon séjour avec eux Dr. Benoîte Bourdin, Julie Briot et Émilie Ségura. Je voudrais souligner particulièrement Benoîte une grande amie qui a été persévérante de m'enseigner les différentes techniques du laboratoire, de répondre à mes nombreuses questions ainsi que de faire la correction de ce mémoire et surtout les moments agréables passés en sa compagnie. Je remercie aussi Behzad Shakeri qui est parti suivre une autre aventure. J'aimerais remercier Julie Verner pour son aide dans la salle de culture et de m'avoir enseigné la rigueur dans le travail. Je voudrais aussi souligner l'aide précieuse de M. Serge Sénéchal, responsable de l'appareil de cytométrie de flux.

Je souhaite témoigner ma reconnaissance aux Dr Céline Fiset et Dr Sylvie Lesage pour leurs précieux conseils lors de mon comité de parrainage. Je remercie également Dr Rémy Sauvée et Dr. Angelo Calderone pour l'évaluation de mon mémoire. J'aimerais aussi remercier la FESP pour m'avoir accordée la Bourse de rédaction ainsi que la Bourse d'excellence.

Je remercie de tout mon cœur ma famille : Normand, Louise, Josée et mes sœurs adorées. Finalement, Louis sans qui je n'aurais jamais passé à travers cette étape et qui m'a toujours supportée autant dans les moments joyeux que les moments difficiles.

# 1 INTRODUCTION

Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est un cation divalent qui joue un rôle important dans le bon fonctionnement de l'organisme. La majorité du  $\text{Ca}^{2+}$  se retrouve dans les os et les dents, où il y joue un rôle structural. Il est très rarement libre dans le corps humain, car il est chélaté avec d'autres ions. Les expériences de Sydney Ringer publiées en 1883 (Ringer 1883 a, b) permettent d'affirmer que les ions sodium ( $\text{Na}^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ) et  $\text{Ca}^{2+}$  sont associés avec la contraction cardiaque d'une grenouille et les sels de  $\text{Ca}^{2+}$  sont nécessaires pour permettre de maintenir une fréquence normale du battement pour plusieurs heures (Miller et al. 2005).

## 1.1 Rôles physiologiques du $\text{Ca}^{2+}$

Dans un organisme, les cellules effectuent des tâches bien précises selon leurs fonctions. Par exemple, les cellules souches vont se différencier en cellules cardiaques qui se contractent ou en neurones qui transmettent de l'information. Les eucaryotes ont développé des voies complexes afin de produire et de transmettre l'information à l'aide de messagers premiers (directement) et de messagers seconds (indirectement). Ceux-ci permettent de relayer des signaux extracellulaires vers des activités cellulaires telles que l'expression d'un gène-cible ou le couplage excitation-contraction des cellules cardiaques (Carafoli et al. 2001). L'ion  $\text{Ca}^{2+}$  est un messager second qui joue un rôle dans plusieurs processus cellulaires. Cette multiplicité de rôles résulte de la capacité de la cellule à interpréter les variations de la concentration intracellulaire de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge et al. 2000).

Plusieurs protéines aident à maintenir l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule comme les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , les canaux calciques activés par le voltage, les pompes  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase ou les protéines qui tamponnent le calcium libre comme la calnexine (Berridge et al. 2003). Celles-ci permettent de contrôler les variations de concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Le  $\text{Ca}^{2+}$  intervient lors de la fertilisation et dans plusieurs processus de développement. Lorsque les cellules sont différenciées, le  $\text{Ca}^{2+}$  opère notamment au niveau de la contraction cardiaque, la sécrétion, l'expression des gènes, le métabolisme,

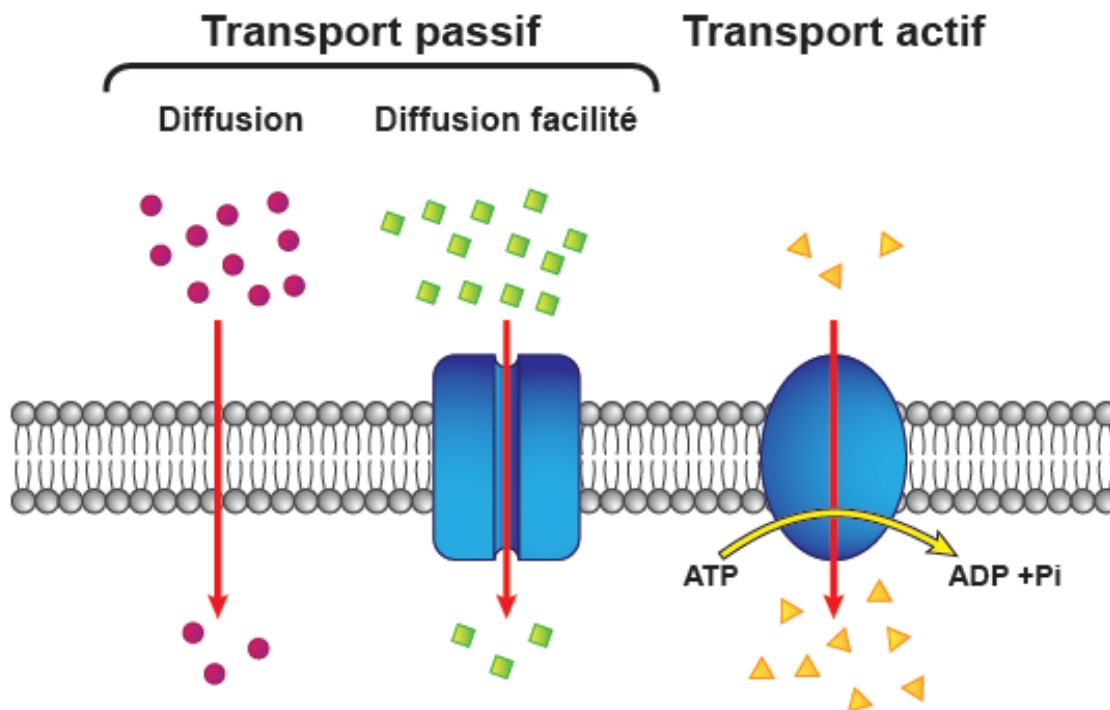
la prolifération, l'apprentissage et la mémoire (Berridge et al. 1999).

### **1.1.1 Distribution dans la cellule**

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  se retrouvent de part et d'autre de la membrane cellulaire à des concentrations libres de 1 à 2 mM dans le milieu extracellulaire et de 0,1  $\mu\text{M}$  dans le cytoplasme. Ceci ne tient pas compte la concentration de l'ion calcique dans les organelles internes (réticulum sarcoplasmique, noyau). Selon ce gradient, le flux d'ion se dirige vers l'intérieur de la cellule. Chez les mammifères, c'est le  $\text{Ca}^{2+}$  qui possède le gradient électrochimique le plus important de tous les ions (Dong et al. 2006). Le maintien de cette homéostasie calcique est important pour le bien être de la cellule. Deux voies sont impliquées dans l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol; soit par le milieu extracellulaire à travers la membrane plasmique via les canaux calciques membranaires, soit par les canaux calciques internes du réticulum sarcoplasmique (RS) ou endoplasmique (RE) qui constitue une réserve de  $\text{Ca}^{2+}$  permettant d'augmenter de façon importante la concentration cytosolique.

### **1.1.2 Transport membranaire de l'ion $\text{Ca}^{2+}$**

La membrane plasmique est constituée d'une double couche de phospholipides et de protéines. Les phospholipides forment une barrière stable entre deux compartiments aqueux. Ils sont présents autant dans la membrane plasmique que dans les organelles (réticulum, l'appareil de Golgi, lysosomes). Les phospholipides sont constitués d'une tête phosphates polaire et de chaînes d'acides gras. Cette première est composée d'un groupement phosphate et de molécules polaires, ce qui rend la tête hydrophile. La queue tant qu'à elle est constituée d'hydrocarbures hydrophobes. Ainsi, les phospholipides ont un comportement amphiphile. Le  $\text{Ca}^{2+}$  ne peut traverser par diffusion passive à travers la membrane plasmique suivant son gradient de concentration puisque celle-ci est imperméable à tous les ions (Carafoli et al. 2001).



**Figure 1.1. Différents mode de transport à travers la membrane.** Il existe deux modes de transport des substrats. Soit le transport passif qui n'utilise aucune source d'énergie (les canaux) soit le transport actif où une source d'énergie (par exemple l'ATP dans les cellules de mammifère) est nécessaire afin de faire passer un substrat contre son gradient électrochimique (les pompes).

Des protéines de transport laissent passer les substrats chargés et les ions à travers la membrane comme les canaux ioniques, les échangeurs, les pompes ou les transporteurs (**Figure 1.1**) qui permettent un transport actif ou passif. Les pompes et les échangeurs donnent lieu à un transport actif. Celui-ci s'effectue contre le gradient électrochimique et une demande d'énergie est nécessaire. L'adénosine triphosphate (ATP) est la principale source d'énergie pour ce type de transport. Le transport passif utilise le gradient électrochimique favorable d'un ion sans dépense énergétique; on trouve dans cette catégorie les canaux ioniques et les transporteurs qui mènent à un transport facilité. Ces protéines transmembranaires qui transportent des molécules chargées facilitent le passage de ces substances tout en diminuant la barrière d'énergie libre.

Les cellules contrôlent très minutieusement la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$ . Quatre types de canaux calciques permettent de réguler la concentration intracellulaire par un transport passif de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ :

- Les canaux calciques activés par le voltage ( $\text{Ca}_v$ ) sont exprimés dans les cellules excitables soit les cellules musculaires et les cellules neuronales. Ils sont activés par la dépolarisation de la membrane plasmique.
- Les canaux calciques activés par un ligand sont majoritairement exprimés dans les cellules sécrétrices et dans les terminaisons nerveuses. Ils sont activés par un ligand extracellulaire tel que le glutamate qui se lie sur le récepteur NMDA et l'acétylcholine qui se lie sur le récepteur nicotinique (Berridge et al. 2003).
- Les canaux calciques activés mécaniquement par une déformation cellulaires. Ils sont exprimés dans plusieurs type de cellules comme les cellules épithéliales de la trachée (Boitano et al. 1992) et les cellules cardiaques (Dostal et al. 1998) entre autres.
- Les canaux calciques activés par une diminution de la réserve de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum endoplasmique par le mécanisme d'entrée capacitative de  $\text{Ca}^{2+}$  (CCE) (Carafoli et al. 2001).

Dans le but de maintenir l'homéostasie calcique, le  $\text{Ca}^{2+}$  doit sortir du cytoplasme ou retourner vers le réticulum sarcoplasmique (SERCA) après une stimulation quelconque. Deux mécanismes permettent de faire sortir le  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu extracellulaire. Un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) et des pompes  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase exprimés à la membrane plasmique (Carafoli et al. 2001).

## **1.2 Canaux calciques activés par le voltage**

Les canaux activés par le voltage sont les canaux calciques les mieux connus. Ce sont des protéines membranaires permettant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule suite à une dépolarisation membranaire. Le mouvement d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à travers le canal  $\text{Ca}_v$  est déterminé par l'importance du gradient chimique couplé à la présence d'un potentiel membranaire. Ces canaux régulent l'influx d'ions calciques qui influencent les fonctions nerveuses, musculaires et hormonales (Ganong 2005). Plusieurs classes de canaux



activés par le voltage existent. Leur différenciation est basée sur leurs propriétés physiologiques et pharmacologiques.

Les canaux  $Ca_v$  se distinguent en fonction de leur seuil d'activation. Ils sont activés soit par une faible dépolarisation (Low-Voltage-Activated, LVA) ou par une forte dépolarisation (High-Voltage-Activated, HVA). Les canaux LVA sont activés à partir d'un potentiel membranaire de -70 mV. Ils sont aussi appelés les canaux de type T pour «Tiny» ou «Transient» en raison de leur petite conductance et de leur inactivation rapide. Ces canaux sont sensibles aux «Mibefradil» et à la «Penfluridol». Les canaux de type L font partie des canaux HVA; ils sont appelés ainsi pour «large» ou «long-lasting», car ceux-ci ont une inactivation plus lente que les canaux de type-T. Les canaux de type L sont activés à des potentiels membranaires entre -30 et -20 mV. Ces derniers sont sensibles aux composés de la famille des dihydropyridine (DPH) qui forme la plus grande classe d'antagonistes de canaux calciques (Carafoli et al. 2001). Ils sont aussi sensibles aux Phénylalkylamines (PAA) et aux Benzothiazépines (BTZ) (Flynn et al. 2000). Les courants HVA produits par les canaux de type N, R, P/Q se retrouvent dans les neurones. Chaque type est respectivement inhibé par le SNX-482, l' $\omega$ -conotoxine GVIA et l' $\omega$ -agatoxine IVA (Nowycky et al. 1985) (Fox et al. 1987).

Les canaux activés par la dépolarisation membranaire sont composés de trois ou quatre sous-unités:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2\delta$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Curtis et Catterall 1986). Les canaux calciques sont classés (**Tableau 1**) selon les propriétés biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité principale  $Ca_v\alpha$  qui forme le pore du canal. La nomenclature moléculaire utilisée s'inspire grandement de la nomenclature des canaux potassiques. Elle est représenté comme suit:  $Ca_vx.y$  où «x» est le chiffre qui représente la famille tandis que le «y» désigne les membres d'une même famille. Il existe 10 sous-unités  $Ca_v\alpha_1$  qui sont distribuées dans trois familles distinctes ; la famille  $Ca_v1$  représente les canaux de type L,  $Ca_v2$  représente les canaux neuronaux de type P/Q, N, R et  $Ca_v3$  comprend les canaux de type T. Les sous-unités auxiliaires  $Ca_v\beta$ ,  $Ca_v\alpha_2\delta$  et  $Ca_v\gamma$  permettent de moduler l'activité de la sous-unité principale des canaux  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . Leur nomenclature est la suivante :  $Ca_v\beta nm$ ,  $Ca_v\alpha_2\delta nm$  et  $Ca_v\gamma nm$  où le n correspond au membre de la protéine/gène et le m réfère aux différents isoformes (Ertel et al ,2000).

La comparaison des séquences primaires des sous-unités principales des canaux calciques entre la famille HVA et LVA montre une homologie de moins de 30% et une homologie de 50% entre les deux sous-familles HVA,  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . Les différents canaux  $Ca_v1$  possèdent un minimum de 80% d'homologie de séquence primaire (**Figure 1.2**).

### **1.2.1 Les canaux HVA**

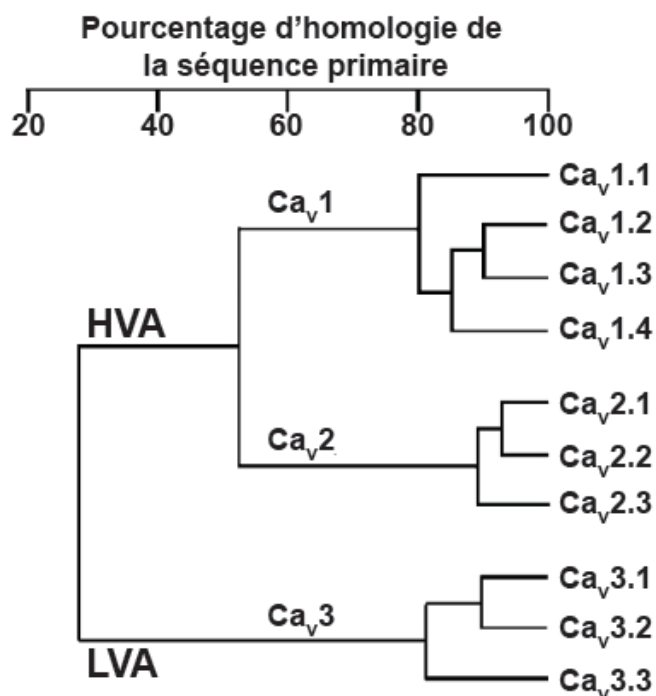
La famille des canaux HVA est composée de  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . Ces deux familles de canaux exigent une forte dépolarisation membranaire pour passer à l'état ouvert, mais se distinguent par leurs cinétiques d'activation et d'inactivation ainsi que par leur distribution tissulaire. La sélectivité des canaux calciques pour le  $Ca^{2+}$  est très grande ( $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^+} > 1000$ ), ainsi dans un milieu physiologique contenant plusieurs cations monovalents, le  $Ca^{2+}$  sera le cation favorable. Cependant, il est possible d'obtenir des courants en présence d'autres cations divalents tels que de barium ( $Ba^{2+}$ ) ou de strontium ( $Sr^{2+}$ ) mais avec de plus faibles affinités que celles du  $Ca^{2+}$  (Yoshii et al. 1988).

### **1.2.2 Canaux calciques de type $Ca_v1$**

Les canaux  $Ca_v1$  présentent des courants de type L qui sont présents dans les muscles squelettiques, lisses cardiaques et dans la rétine. Cette famille est jusqu'à présent composée de  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  et  $Ca_v1.4$ . Ces canaux sont activés suite à une forte dépolarisation et s'inactivent rapidement en présence de  $Ca^{2+}$  (CDI) (Hess et al. 1984; Cavalie et al. 1986). Les inhibiteurs ou agents bloqueurs comme les dihydropyridines (DHP), les phénylalkylamines (PAA) et les benzothiazépines (BTZ) permettent d'identifier cette famille de canaux calciques. Plusieurs médicaments provenant de ces familles de composés chimiques sont couramment utilisés pour traiter l'hypertension, l'angine et certains types d'arythmies cardiaques (Nowycky et al. 1985; Triggle 1999; Catterall et al. 2005).

**Tableau 1: Classification, nomenclature, localisation tissulaire et propriétés pharmacologiques des canaux calciques activés par le voltage** (Birnbaumer et al. 1994; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005; Catterall 2011).

| Classification fonctionnelle | Type | Canal ( $\text{Ca}_v\alpha 1$ ) | Ancienne nomenclature | Localisation tissulaire                                  | Inhibiteurs   |
|------------------------------|------|---------------------------------|-----------------------|--|---|
| HVA                          | L    | $\text{Ca}_v1.1$                | $\alpha 1S$           | Muscles squelettiques, et cardiaques, neurones et rétine | Dihydropyridines (DHP)<br>Phénylalkylamines (PAA)<br>Benzothiazépines (BTZ) |
|                              |      | $\text{Ca}_v1.2$                | $\alpha 1C$           |  |   |
|                              |      | $\text{Ca}_v1.3$                | $\alpha 1D$           |  |   |
|                              |      | $\text{Ca}_v1.4$                | $\alpha 1F$           |  |   |
|                              | P/Q  | $\text{Ca}_v2.1$                | $\alpha 1A$           | Neurones   | $\omega$ -agatoxine IVA   |
|                              | N    | $\text{Ca}_v2.2$                | $\alpha 1B$           |  | $\omega$ -conotoxine GVIA   |
|                              | R    | $\text{Ca}_v2.3$                | $\alpha 1E$           |  | SNX-482   |
| LVA                          | T    | $\text{Ca}_v3.1$                | $\alpha 1H$           | Neurones et cardiaques                                   | Mibefradil, U92032, Penfluridol, Pimozide                                   |
|                              |      | $\text{Ca}_v3.2$                | $\alpha 1G$           |  |   |
|                              |      | $\text{Ca}_v3.3$                | $\alpha 1I$           |  |   |



**Figure 1.2 : Arbre phylogénétique des canaux  $\text{Ca}_v$ .** Les canaux LVA et HVA partagent une homologie de séquence de 25%, alors que les canaux d'une même famille partagent une homologie de l'ordre de 80%. Modifié de (Lacinova 2005)

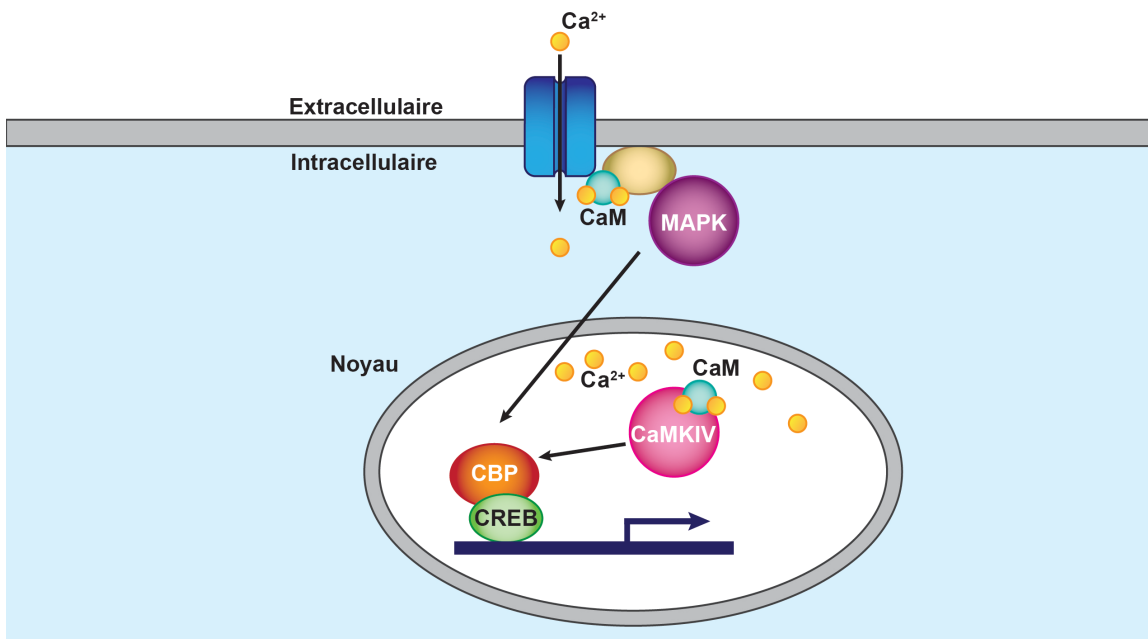
### 1.2.3 Rôle physiologique des canaux calciques de type L

La variation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  module de nombreux processus physiologiques, dont la contraction, la sécrétion, l'expression des gènes et plusieurs voies de signalisation. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est l'élément intermédiaire entre l'excitation et la contraction du muscle dans le couplage excitation-contraction.

#### 1.2.3.1 Couplage excitation-transcription

Un processus physiologique dans lequel le  $\text{Ca}^{2+}$  joue le rôle d'un second messenger important est la voie de signalisation menant à l'expression des gènes. Les canaux de type-L sont impliqués dans la signalisation vers le noyau (**Figure 1.3**). L'association entre les canaux  $\text{Ca}_v1$  et «cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element binding protein» (CREB) via des complexe de signalisation, notamment grâce à la calmoduline (CaM) (Dolmetsch 2003) conduit à la phosphorylation de la sérine de CREB suite à l'activation de la voie enzymatique Ras/«Mitogen-activated protein kinase» (MAPK) ou par la «calmodulin-activated kinase IV» (CaMKIV) (Dolmetsch, 2001). La protéine CREB est un facteur de transcription qui, lorsque phosphorylé se liera sur une séquence d'ADN

de type CRE (« cAMP Response Element ») ce qui permet de réguler la transcription du gène associé.



**Figure 1.3. Couplage excitation-transcription** Les canaux de type L utilisent la CaM pour détecter les élévations locales de  $\text{Ca}^{2+}$  et ainsi activer la transcription de gènes par la voie des MAPKs. Certains signaux calciques sont obtenus par la phosphorylation de CBP (CREB binding protein) par la CaM kinase IV. La protéine CREB est un facteur de transcription qui, lorsqu'elle est phosphorylée, se lie sur une séquence d'ADN de type CRE (« cAMP Response Element »). La liaison de la protéine CREB sur la séquence CRE ainsi que son interaction avec le coactivateur CBP permettent de réguler la transcription du gène associé (figure inspirée de Dolmetsch 2003).

La mutation du site IQ où se lie la calmoduline sur les canaux de type-L réduit l'activité de CREB et l'activation de la voie Ras/MAPK (Dolmetsch, 2001). Cependant, l'inactivation par le calcium des canaux de type L n'est pas requise pour la signalisation jusqu'à CREB, car la mutation de la région «EF hand» où le calcium se lie au canal induit toujours la phosphorylation de CREB (Dolmetsch, 2001). Ainsi, la signalisation vers le noyau suite au signal calcique exige spécifiquement la liaison de CaM au motif IQ des canaux de type-L. La liaison entre ces deux protéines pourrait initier un changement de la conformation du canal ou encore stimuler d'autres voies de signalisation (Dolmetsch, 2001). Ce changement active la cascade Ras/MAPK. De façon générale, le calcium active la protéine kinase C (PKC) qui permet par la suite de phosphoryler et d'activer la Sérine/thréonine kinase Raf1. Cette dernière stimule la cascade «Extracellular signal-

regulated kinase 1 and 2» (ERK1/2). La famille «p90 ribosomal S6 kinase» (RSK) est un substrat des ERK. L'isoforme RSK2 permet la phosphorylation de CREB à la sérine 133 induisant la transcription du gène donné (Sun et al. 2004). De plus, il existe un mécanisme de couplage direct entre le canal et le noyau puisqu'un fragment de l'extrémité C-terminale de  $\text{Ca}_v1.2$  serait capable de se transloquer dans le noyau et de réguler ainsi la transcription de gènes importants pour l'excitabilité et la signalisation neuronale (Gomez-Ospina et al. 2006).

### **1.2.3.2 Couplage excitation-contraction du muscle squelettique**

Les myofilaments des muscles sont composés de l'actine, de la tropomyosine, de la troponine et de la myosine. La tropomyosine est une longue et mince protéine qui est liée à la troponine en conditions de repos. Lorsque la troponine est liée à l'actine, la tropomyosine est positionnée afin de prévenir les têtes de myosine de lier l'actine et empêche donc la contraction.

Le couplage excitation-contraction (**Figure 1.4**) des muscles squelettiques commence par la propagation d'un potentiel d'action le long de la fibre musculaire. Cette dépolarisation de la membrane du tubule-T est détectée par les canaux  $\text{Ca}_v1.1$  et active directement le récepteur à la ryanodine de type 1 (RyR1) du réticulum sarcoplasmique puisqu'il existe une interaction mécanique directe entre le canal  $\text{Ca}_v1.1$  et RyR1. L'activation de ces récepteurs permet la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique ce qui augmente considérablement la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Cette relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du réticulum sarcoplasmique est contrôlée par les senseurs de voltage du canal  $\text{Ca}_v1.1$  qui induit un changement conformationnel de la protéine et active RyR1 (Adams et al. 1990; Rios et al. 1991). L'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique pendant le potentiel d'action permet la liaison du calcium sur la troponine C ce qui entraîne un changement de conformation et un déplacement de la tropomyosine démasquant ainsi les sites de liaison actine-myosine. L'interaction entre l'actine et la myosine permet le glissement des filaments et entraîne la contraction musculaire. Un arrêt rapide du relargage par le RS est observé lorsque les senseurs de  $\text{Ca}_v1.1$  ne sont plus activés (Lamb, 2000). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est alors repompé dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) qui hydrolyse l'ATP afin de faire entrer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  contre le gradient électrochimique. L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  joue aussi

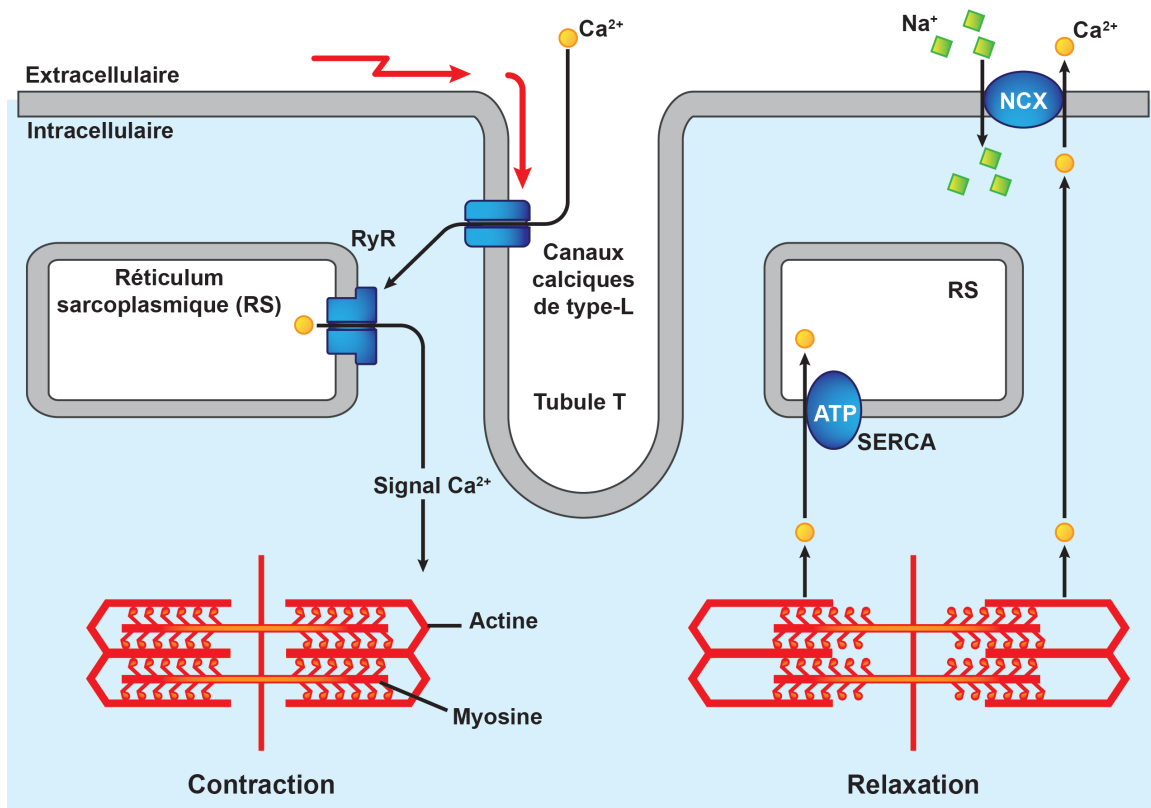
un rôle dans ce processus en sortant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu extracellulaire. La diminution de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire engendre la relaxation du muscle (Guénard, 2001).

### **1.2.3.3 Couplage excitation-contraction du muscle cardiaque**

Le couplage excitation-contraction du muscle cardiaque est très similaire au couplage excitation-contraction du muscle squelettique à l'exception que dans les muscles cardiaques, l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  via le canal de type L  $\text{Ca}_v1.2$  augmente la concentration locale entre la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique. Cette entrée est nécessaire pour le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes. Le  $\text{Ca}^{2+}$  lie par la suite le récepteur à la ryanodine de type 2 (RyR2) ce qui permet son ouverture et stimule la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du réticulum sarcoplasmique. Ce processus est le « $\text{Ca}^{2+}$ -induced- $\text{Ca}^{2+}$ -release» (CICR). Contrairement au couplage excitation-contraction des muscles squelettiques, les canaux  $\text{Ca}_v1.2$  et le récepteur RyR2 ne sont pas en interaction directe. Cependant, certaines protéines, telles que Homer1 (Worley et al. 2007) et la sorcine interagissant avec RyR2 d'une part et avec l'extrémité C- terminale de  $\text{Ca}_v1.2$  d'autre part, pourraient favoriser le couplage fonctionnel (Meyers et al. 1998). L'ion  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à la troponine C ce qui permettra à la tête de myosine de se lier au filament d'actine et entraîner la contraction du muscle cardiaque. Il y a relaxation musculaire lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire retourne à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique ou vers le milieu extracellulaire.

La stimulation du système sympathique développe les contractions cardiaques et accélère la relaxation, soit le retour à la normale de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule (Bers, 2002). La stimulation du récepteur adrénergique  $\beta 1$  active une protéine  $\text{G}\alpha_s$ , ce qui augmente l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et active la protéine kinase A (PKA). La PKA permet la phosphorylation du canal  $\text{Ca}_v1.2$ , des RyRs, de la troponine et de la protéine qui lie la myosine C et le phospholamban (PLN). La relaxation dépend de la vitesse d'élimination du  $\text{Ca}^{2+}$  via SERCA. Cette activité de SERCA est régulée par son interaction physique avec le phospholamban. Quand celui-ci n'est pas phosphorylé par la PKA, il inhibe la fonction de SERCA, mais dans sa forme phosphorylée, le phospholamban se dissocie de SERCA, ce qui active la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase. Donc AMPc, permet d'augmenter à la fois la relaxation et de s'assurer d'avoir

des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$ .



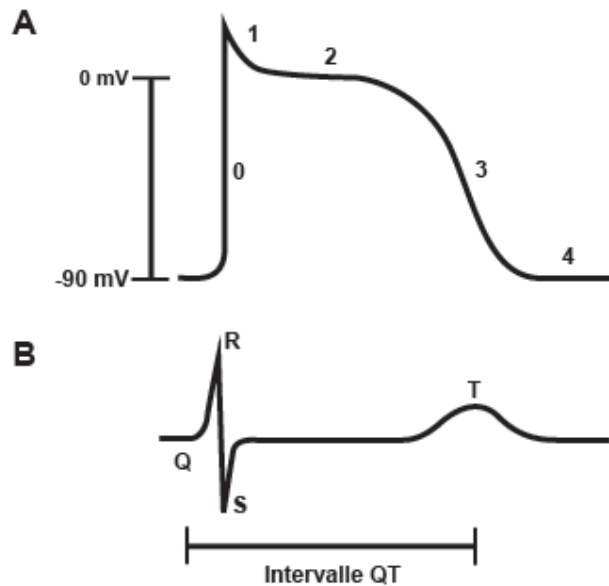
**Figure 1.4. Couplage excitation-contraction** Le mécanisme du couplage excitation-contraction dans le muscle cardiaque et celui dans les muscles squelettique sont très similaires. Cependant, l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  par  $\text{Ca}_v1.2$  est nécessaire pour le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes tandis que c'est le senseur de voltage de  $\text{Ca}_v1.1$  qui plus important dans les muscle squelettique. L'activation du canal RyR par soit un changement de conformation via  $\text{Ca}_v1.1$  ou par « $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release » (CICR) induit le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans le réticulum sarcoplasmique. L'augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne le glissement des filaments d'actine (« Myofilaments »). Suite à la contraction, le  $\text{Ca}^{2+}$  est repompé dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe SERCA ou à l'extérieur de la cellule par l'échangeur NCX. La diminution de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire engendre alors la relaxation du muscle cardiaque (Inspiré de Pearson 2013).



#### 1.2.3.3.1 Rôle du canal $Ca_v1.2$ dans la rythmicité cardiaque

L'influx de  $Ca^{2+}$  à travers le canal  $Ca_v1.2$  prolonge la dépolarisation pendant le potentiel d'action. Le potentiel d'action des cardiomyocytes ventriculaires tel que mesuré par des électrodes intracellulaires est composé de 5 phases distinctes (Ikonnikov et al.2012) (**Figure 1.5 A**). La phase 0 correspond à la phase de dépolarisation. Suite à un stimulus électrique, les courants sodiques génèrent un courant entrant de très forte amplitude alors que dans les cellules du noeud sinusal, la phase 0 dépend de l'activation des canaux calciques de type L. La repolarisation partielle que constitue la phase 1 du potentiel d'action ventriculaire résulte à la fois de l'inactivation des canaux sodiques et de l'activation d'un courant potassique appelé  $I_{to}$ . La phase 2 forme la phase plateau du potentiel d'action. L'influx calcique à travers le canal  $Ca_v1.2$  vers l'intérieur de la cellule est contrebalancé par la sortie de  $K^+$ , ce qui génère un potentiel membranaire relativement stable pour plusieurs millisecondes. L'inactivation des canaux calciques précipite la phase 3 au cours de laquelle la repolarisation membranaire par les courants  $K^+$  domine l'activité électrique. La phase 4 correspond au potentiel de repos de la membrane cellulaire. Le potentiel de repos dans le myocarde ventriculaire est de -85 à -90 mV. Il est majoritairement dicté par le potentiel d'équilibre du  $K^+$  selon le gradient de part et d'autre de la membrane et est contrôlé par l'activité du canal potassique à rectification entrante  $Kir2.1$ . Les pompes à ions ( $Na^+ K^+ ATPase$ ) et les échangeurs ( $Na^+/Ca^{2+}$ ) permettent le rétablissement des gradients ioniques. Cette phase correspond à la diastole, soit à la relaxation du muscle cardiaque.

Une mesure de l'activité électrique des cardiomyocytes ventriculaires peut être estimée par l'analyse de l'électrocardiogramme (Ikonnikov et al. 2012) (**Figure 1.5 B**). Contrairement au potentiel d'action intracellulaire, l'électrocardiogramme est une méthode non invasive, que l'on obtient avec des électrodes placées sur le corps du patient. Quoique l'électrocardiogramme résume l'activité électrique de tous les tissus cardiaques, les ondes les plus importantes reflètent l'activité des ventricules.



**Figure 1.5. A. Potentiel d'action cardiaque** enregistré par une microélectrode intracellulaire avec 5 phases principales : la phase 0 qui est la dépolarisation (activation des canaux sodiques), la phase 1 qui représente la repolarisation précoce, la phase 2 qui est la phase plateau (activation des canaux calciques et potassiques), la phase 3 qui est la repolarisation (activation des canaux potassiques) et la phase 4 qui représente le potentiel de repos. **B. Électrocardiogramme** L'intervalle QT constitue une mesure non invasive de la période de repolarisation des ventricules. L'onde QRS correspond à la dépolarisation des ventricules tandis que l'onde T marque la repolarisation des ventricules. L'activité des canaux  $\text{Ca}_v1.2$  détermine donc en partie la durée de la repolarisation QT.

L'QRS correspond à la dépolarisation des ventricules alors que l'onde T traduit sa repolarisation. L'intervalle QT mesuré du début du complexe QRS à la fin de l'onde T, représente l'ensemble de la dépolarisation et de la repolarisation ventriculaire. Sa durée varie en fonction de la fréquence cardiaque. Les intervalles QT sont considérés normaux lorsque les valeurs varient de 350 à 480 ms et sont généralement un peu plus longs chez la femme que chez l'homme (Johnson et al. 2009). Du fait de l'important influx calcique, l'activité du canal  $\text{Ca}_v1.2$  contrôle en partie les intervalles de repolarisation QT.

#### 1.2.4 Canaux calciques neuronaux

L'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les canaux calciques neuronaux activés par le voltage active divers processus cellulaires tels le relargage de neurotransmetteurs, l'activation d'enzymes dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que la régulation de l'excitabilité neuronale

(Wheeler, Randall et al. 1994; Dunlap, Luebke et al. 1995). Les types de courants qui sont observés dans le système nerveux central sont les courants de type T, N, L, P/Q et R. Cependant, les courants prédominaux dans les terminaisons présynaptiques sont les courants de type P/Q ( $\text{Ca}_v2.1$ ) et N ( $\text{Ca}_v2.2$ ) (Stanley 1997). Les courants de type-L sont obtenus par les  $\text{Ca}_v1.2$  et  $\text{Ca}_v1.3$  situés dans les cellules somatiques et dans les épines et embranchements dendritiques des neurones (Di Biase et al. 2008; Jenkins et al. 2010). Ces canaux permettent l'activation du couplage excitation-transcription par des voies dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ils participent à différentes formes d'apprentissage et au développement neuronal (Striessnig et al. 2014).

### **1.2.5 Pathologies associées aux canaux HVA**

Un mauvais fonctionnement des canaux HVA peut avoir des répercussions très importantes dans l'activité d'une cellule et peut causer d'importantes pathologies. L'effet fonctionnel des mutations des canaux  $\text{Ca}_v$  a été évalué dans des modèles de souris transgéniques où l'expression du gène est supprimée (modèle «knock-out»). Plusieurs mutations peuvent altérer la fonction du canal soit en augmentant son activité (un gain de fonction) ou en diminuant son activité (perte de fonction). Ces deux effets amènent souvent à des problèmes pathologiques dans plusieurs tissus (McKeown, Robinson et al. 2006). Les mutations de chacune des sous-unités ( $\text{Ca}_v\alpha1$ ,  $\text{Ca}_v\beta$  et  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ ) peuvent causer des pathologies puisque leur présence est nécessaire pour le bon fonctionnement du canal.

Les mutations invalidant le gène codant pour  $\text{Ca}_v1.1$  sont létales chez la souris (Beam et al. 1986). Ces souris sont caractérisées par un développement embryonnaire normal mais suivi d'un arrêt respiratoire lors de la naissance de l'animal. De plus, un modèle de souris qui possède la mutation R528H dans le gène codant  $\text{Ca}_v1.1$  montre des courants entrants anormaux lors du potentiel de repos (Wu et al. 2012). Chez l'homme, l'invalidité du gène de  $\text{Ca}_v1.1$  par mutation qui altère le cadre de lecture de la protéine, amène à la paralysie périodique hypokalémique (HypoPP) (Jurkat-Rott et al. 2002). Les fibres musculaires de ces animaux montrent de longues dépolarisations qui mènent à une perte d'excitabilité. Une mauvaise fonction de ce canal est aussi associée avec l'hyperthermie maligne. De plus, cinq mutations qui altèrent le cadre de lecture de  $\text{Ca}_v1.1$  ne permettent pas l'activation du canal ce qui empêche la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  par le

réticulum sarcoplasmique (Yarotsky et Dirksen 2013).

Les souris dans lesquelles le gène codant pour  $Ca_v1.2$  a été invalidé meurent durant leur développement embryonnaire en raison d'insuffisance cardiovasculaire, confirmant le rôle fondamental de ce canal dans le mécanisme de contraction cardiaque (Seisenberger, Specht et al. 2000).

Les propriétés cinétiques de ce canal doivent être étroitement réglées afin que la dépolarisation et la contraction soient synchronisées avec les cycles de systole et de diastole du cœur. Un prolongement de l'influx calcique pendant la phase plateau mène à un délai de repolarisation ventriculaire (QT long) tandis que une diminution de l'entrée de  $Ca^{2+}$  mène à un intervalle plus court de repolarisation (QT court) (Cerrone et al. 2012). Les intervalles de QT sont associés avec une augmentation du risque de mort cardiaque subite (Arking et al. 2014). Chez l'Homme, un gain de fonction du canal  $Ca_v1.2$  suite à la mutation de la sous-unité principale  $Ca_v\alpha1$  cause le syndrome de Timothy. Ce syndrome, qui est caractérisé par un dérèglement multi-systémique, comprend, entre autres, la syndactylie, l'immunodéficience, un QT long et le syndrome de mort subite du nouveau-né (Splawski et al. 2004; Splawski et al. 2005). Ces mutations réduisent l'inactivation du canal (Splawski et al. 2004; Barrett et al. 2008). Ceci augmente indûment le flux calcique et prévient la repolarisation adéquate des cardiomyocytes donc augmente le risque d'arythmie ventriculaire. Les patients atteints de cette maladie peuvent développer des retards mentaux (Gillis et al. 2012) ou l'autisme (Splawski et al. 2005). Les mutations (G406R et G402S) de cette pathologie ont été identifiées dans le segment S6 du domaine I (IS6). D'autres mutations ont été mises au jour en dehors du segment IS6 et causent un gain de fonction avec une augmentation de l'amplitude du courant ou une diminution de l'inactivation, et/ou une augmentation des courants entrants à des voltage négatifs (Fukuyama et al. 2014; Hennessey et al., 2014; Boczek et al., 2015; Wemhöner et al. 2015). Des mutations de  $Ca_v1.2$  sont aussi associées dans plusieurs arythmies cardiaques comme le syndrome de Brugada (Napolitano et al. 2011).  $Ca_v1.2$  est exprimé dans la plupart des régions du cerveau donc un gain de fonction peut aussi altérer la fonction neuronale et le développement. Une étude génomique GWASs (Genome-wide association study) a démontré une grande association entre le gène codant pour  $Ca_v1.2$  et plusieurs désordres psychologiques comme la bipolarité, la schizophrénie, la

dépression majeure, polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) (Bhat et al. 2012).

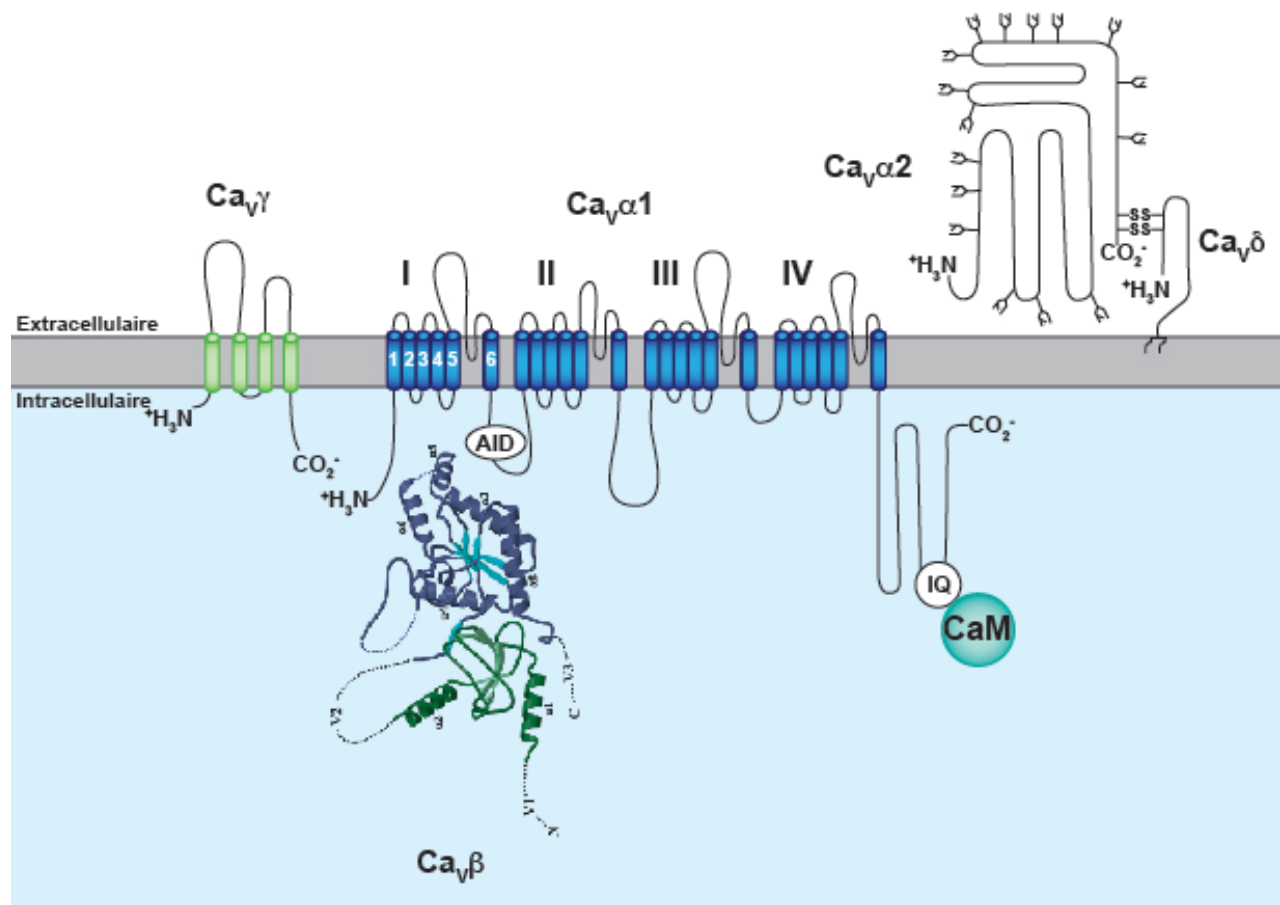
Des mutations dans  $\text{Ca}_v1.3$  sont associées à la maladie de Parkinson, à des dysfonctions cardiaques, à la surdité et à des pathologies neuropsychiatriques comme l'autisme (Zamponi et al. 2015). Les souris  $\text{Ca}_v1.3$  «knock-out» montrent des bradycardies, des arythmies et des troubles auditifs majeurs (Baig et al. 2011). Elles sont malgré tout viables. Leur surdité congénitale s'explique par une perte totale d'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules ciliées de la cochlée, causant ainsi un important changement dans la morphologie de celles-ci. Dans le cœur,  $\text{Ca}_v1.3$  joue un rôle important dans l'induction de l'activité rythmique cardiaque dans les cellules du nœud sino-auriculaire grâce à son seuil d'activation (-55 mV) relativement moins élevé que  $\text{Ca}_v1.2$  (-20 mV) (Zhang et al. 2005; Xu et al. 2001).

Le canal  $\text{Ca}_v1.4$  est le canal calcique de type-L le plus prédominant dans les neurones de la rétine. Une altération de cette protéine cause la rétinite pigmentaire de type 2. L'absence complète de fonction de ce canal ou l'altération de ces propriétés d'ouverture élimine/diminue l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  qui habituellement permet une signalisation normale des photorécepteurs de la rétine via (Stockner et al. 2013) Ces mutations entraînent une interruption de la signalisation calcique et de la transmission synaptique au niveau des terminaisons des photorécepteurs de la rétine et perturbent l'organisation cellulaire de celle-ci chez la souris (Mansergh, Orton et al. 2005).

### 1.2.6 Structure quaternaire $\text{Ca}_v1$

Les canaux calciques  $\text{Ca}_v1$  sont composés de 3 ou 4 sous-unités (**Figure 1.6**). La sous-unité principale est appelée  $\text{Ca}_v\alpha1$  (sous-familles  $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$  et  $\text{Ca}_v3$ ). Elle est accompagnée de 3 autres sous-unités auxiliaires, les sous-unités  $\text{Ca}_v\beta$ ,  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  et  $\text{Ca}_v\gamma$ . Les sous-unités auxiliaires modulent l'activité de la sous-unité principale. De plus, chaque sous-unité possède différentes isoformes. Les canaux calciques HVA possèdent généralement ces sous-unités dans un ratio stoechiométrique de (1 :1 :1 :1) (Striessnig et al. 1986). Cependant, elles ne sont pas nécessairement associées à la sous-unité principale  $\text{Ca}_v\alpha1$  en tout temps. La régulation par la protéine  $\text{Ca}_v\gamma$  n'est prouvée que pour le canal  $\text{Ca}_v1.1$  (Jay et al. 1990; Arikath et al. 2003). De plus, plusieurs études montrent que seules les sous-unités  $\text{Ca}_v\alpha1$  des canaux HVA sont associées aux sous-

unités auxiliaires  $\text{Ca}_v\beta$  et  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  (Hofmann et al.1999).



**Figure 1.6. Organisation des sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  des canaux calciques de type-L.** Les canaux HVA sont composés principalement des sous-unités  $\text{Ca}_v\alpha 1$ ,  $\text{Ca}_v\beta$  et  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ , seul  $\text{Ca}_v 1.1$  est associé avec  $\text{Ca}_v\gamma$ . Les canaux LVA possèdent seulement  $\text{Ca}_v\alpha 1$ .

### 1.2.6.1 Sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$

$\text{Ca}_v\alpha 1$  forme le pore du canal et détermine les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal. Cette sous-unité principale  $\text{Ca}_v\alpha 1$  possède entre 1870 et 2420 acides aminés selon la famille et l'isoforme, ce qui correspond à environ 212 à 273 kDa (Lacinova 2005). Des études du profil d'hydrophobicité de la séquence primaire de la sous-unité principale prédisent 4 domaines hydrophobes homologues (I à IV) contenant chacun 6 segments  $\alpha$ -hélicoïdaux composés de 20 acides aminés (S1 à S6). Les terminaisons amines et carboxyles de la protéine sont situées du côté cytosolique. Cette structure rappelle grandement celle des canaux potassiques ( $\text{K}_v$ ) et sodiques ( $\text{Na}_v$ ). Tout

comme les canaux  $\text{Na}_v$  de mammifères, les canaux  $\text{Ca}_v$  possèdent quatre domaines différents, ayant pour résultat un pore asymétrique tant au niveau structural que fonctionnel (Parent et Gopalakrishnan 1995; Swartz 2004).

Le segment S4 contient cinq à six arginine (Arg, R) et lysine (Lys, K) qui sont tous deux des acides aminés chargés positivement à un pH physiologique et pourraient jouer le rôle de senseur de voltage. Ces acides aminés sont conservés dans toutes les familles de canaux  $\text{Ca}_v$  (**Figure 1.7**). Il a été proposé qu'un mouvement de rotation vertical du segment S4 des canaux potassiques intervient lors de l'activation (Logothetis et al. 1992; Glauner et al. 1999). Sous l'effet d'une dépolarisation, le segment S4 se déplace vers l'extérieur avec un angle de 30-45° de la cellule et génère un changement de conformation qui ouvre le pore du canal (Bezaniilla 2002). Ainsi, basé sur l'homologie de structure, il est possible d'émettre comme hypothèse que les segments S4 des canaux  $\text{Ca}_v$  jouent un rôle similaire.

La région du pore est située entre les segments S5 et S6. Cette région possède le filtre de sélectivité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Quatre résidus glutamates (EEEE) chargés négativement situés dans chacun des domaines dans la boucle S5S6 forment un site à forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d \approx 1\mu\text{M}$ ). Ces résidus sont hautement conservés et créent ainsi un espace électronégatif dû à la projection des groupements  $-\text{COOH}$  des chaînes latérales. Ceci permet la formation d'une région d'hydratation à l'intérieur du canal (Parent and Gopalakrishnan 1995).

|        | IS4                 | IIS4                 | IIIS4                | IVS4                  |
|--------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Cα 1.1 | VKALRAFRVLRPLRLVSGV | ISVLRRCIRLLRLFKITKYW | VKILRVLRVLRPLRAINRA  | SAFFRLFRVMRLIKLLSRAE  |
| Cα 1.2 | VKALRAFRVLRPLRLVSGV | ISVLRVCVLLRIFKITRYW  | VKILRVLRVLRPLRAINRA  | ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE  |
| Cα 1.3 | VKALRAFRVLRPLRLVSGV | ISVLRVCVLLRIFKVTRHW  | VKILRVLRVLRPLRAINRA  | ITFFRLFRVMRLIKLLSKGE  |
| Cα 1.4 | VKALRAFRVLRPLRLVSGV | ISVFRCVLLRIFKVTRHW   | VKILRVLRVLRPLRAINRA  | ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE  |
| Cα 2.1 | VKALRAFRVLRPLRLVSGV | ISVLRALRLLRIFKVTKYW  | IKSLRVLRVLRPLKTIKRL  | LSFLRLFRAARLIKLLRQGY  |
| Cα 2.2 | VKALRAFRVLRPLRLVSGV | ISVLRALRLLRIFKVTKYW  | IKSLRVLRVLRPLKTIKRL  | LSFLRLFRAARLIKLLRQGY  |
| Cα 2.3 | VKALRAFRVLRPLRLVSGV | ISVLRALRLLRIFKITKYW  | IKSLRVLRVLRPLKTIKRL  | MSFLKLFRAARLIKLLRQGY  |
| Cα 3.1 | FSAVRTVRVLRPLRAINRV | LSVLRTRFRLMRVLKLVRF  | LRVLRLLRTLRLPLRVISRA | IRIMRVLRRIARVLKLLKMAV |
| Cα 3.2 | LSAIRTVRVLRPLRAINRV | LSVLRTRFRLMRVLKLVRF  | LRVLRLLRTLRLPLRVISRA | IRIMRVLRRIARVLKLLKMAT |
| Cα 3.3 | LSAIRTVRVLRPLKAINRV | LSVLRTRFRLMRVLKLVRF  | LRVLRLLRTLRLPLRVISRA | IRIMRVLRRIARVLKLLKMAT |

**Figure 1.7 : Alignement de séquences des segments S4 des canaux VGCC.** Les acides aminés chargés positivement sont surlignés en gris (Lacinova 2005).

Les canaux calciques de type L s'inactivent rapidement en présence d'ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Leur inactivation est dépendante du flux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (CDI soit pour « $\text{Ca}^{2+}$  dépendant inactivation»). Ce processus est contrôlé par la calmoduline (CaM) une protéine ubiquitaire qui joue le rôle de senseur de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'apocalmoduline dépourvue d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , est constitutivement liée au domaine IQ (Isoleucine, Glutamate) qui se retrouve sur le C-terminal de  $\text{Ca}_v\alpha 1$ . Elle possède quatre sites de liaison aux  $\text{Ca}^{2+}$  qui se replient en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui permet à la calmoduline autour de la protéine-cible de moduler la fonction de celle-ci (Mori, Vander Kooi et al. 2008). La mutation des résidus du motif IQ diminue grandement l'inactivation du canal en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui soutient l'hypothèse du rôle de la calmoduline dans ce processus (Zuhlke, Pitt et al. 1999; Zuhlke, Pitt et al. 2000). De plus, la surexpression d'un mutant dominant négatif de calmoduline (acide aspartique (D) à alanine (A)) élimine également l'inactivation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Peterson et al. 1999). Finalement, la cristallisation du complexe  $\text{Ca}_v1.2\text{-IQ/CaM/Ca}^{2+}$  montre clairement que le domaine IQ de  $\text{Ca}_v1.2$  forme une hélice enchâssée au milieu des lobes N- et C-terminaux de la calmoduline (Van Petegem, Chatelain et al. 2005).

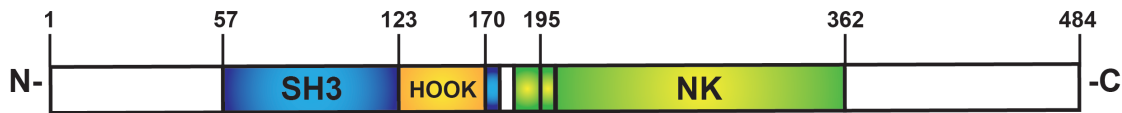
La sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$  qui est entièrement intracellulaire interagit avec la sous-unité principale  $\text{Ca}_v\alpha 1$  du côté cytosolique de la membrane plasmique plus précisément, sur le site AID (Alpha Interaction Domain). Cette région de 18 acides aminés, dont 9 sont hautement conservés dans toutes les sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$  des canaux HVA est localisée sur la boucle cytoplasmique entre le domaine I et II (Pragnell et al. 1994).

#### **1.2.6.2 La sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta$**

La sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$  est importante pour l'adressage membranaire des canaux HVA (Brice et al. 1997; Bichet et al. 2000). Quatre isoformes différentes existent ( $\text{Ca}_v\beta 1$  à  $\text{Ca}_v\beta 4$ ) qui possèdent un poids moléculaire variant entre 52 et 78 kDa (Walker et al. 1998). Les sous-unités  $\text{Ca}_v\beta$  se lient sur la région AID de  $\text{Ca}_v\alpha 1$  avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (3,5 à 53,5 nM) (Van Petegem et al. 2008). La présence de  $\text{Ca}_v\beta$  augmente l'expression membranaire de la sous-unité principale en prévenant sa dégradation par le système ubiquitine/protéasome (Bourdin et al. 2010, Altier et al. 2011). Ceci peut soit être expliqué par une plus grande stabilité de la protéine à la membrane soit par un recyclage plus efficace.  $\text{Ca}_v\beta$  module aussi certaines propriétés biophysiques de «gating» des canaux HVA. De plus, les cinétiques d'inactivation varient



selon l'isoforme co-exprimé avec la sous-unité principale (Parent, Schneider et al. 1997). La co-cristallisation du domaine AID de  $\text{Ca}_v1.2$  avec la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta2$  (Van Petegem et al. 2004) a montré qu'il existe deux régions conservées sur la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$ : le domaine SH3 et le domaine NK.  $\text{Ca}_v\beta$  fait donc partie de la famille des guanylates kinases avec certaines différences dont l'orientation relative des domaines SH3 (« Src homology 3 ») et NK (« nucleotide kinase ») (**Figure 1.8**) (Arikkath et Campbell 2003). C'est le domaine NK qui interagit avec le domaine AID de  $\text{Ca}_v1.2$  ce qui augmente la densité de canaux HVA à la membrane plasmique (Bourdin et al. 2010).



**Figure 1.8: Diagramme de l'organisation schématique des domaines fonctionnels de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta3$  selon la structure cristalline (inspiré de Bourdin, Marger et al. 2010).**

### 1.2.6.3 La sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\gamma$

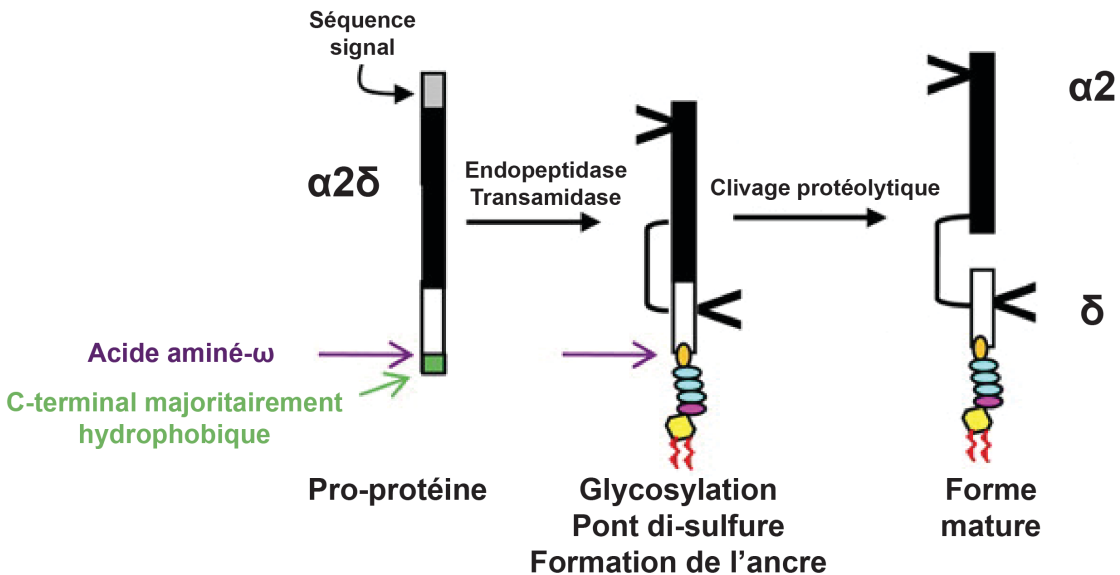
La sous-unité  $\text{Ca}_v\gamma$  est une protéine formée de quatre segments transmembranaires (**Figure 1.6**). Ses extrémités N- et C- terminal se retrouvent dans le cytoplasme. Il existe, à ce jour, huit isoformes  $\text{Ca}_v\gamma1$  à  $\text{Ca}_v\gamma8$  de 25-35 kDa qui sont exprimés dans différents types de tissus. La sous-unité  $\text{Ca}_v\gamma1$  qui a été la première identifiée se retrouve plus spécifiquement dans les muscles squelettiques où les canaux de type L  $\text{Ca}_v1.1$  y sont exprimés (Walker et al. 1998). Le rôle de cette sous-unité n'est cependant pas encore clairement établi par rapport aux deux autres sous-unités (Arikkath et al. 2003). Il a été rapporté selon certaines études que  $\text{Ca}_v\gamma$  peut diminuer (Kang and Campbell 2003) ou augmenter (Rousset, Cens et al. 2001) l'amplitude des courants et déplacerait les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels hyperpolarisants de  $\text{Ca}_v1.1$ .

#### **1.2.6.4 La sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$**

##### **1.2.6.4.1 Structure**

Il existe quatre isoformes ( $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  à  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 4$ ) de cette sous-unité. Elles sont toutes exprimées dans des tissus différents. Cette protéine possède plusieurs domaines hydrophobes (Ellis et al. 1988). Elle doit subir plusieurs modifications co-traductionnelle et post-traductionnelle avant d'être mature. La pro-protéine synthétisée à partir du même gène (CACNA2D) est clivée au niveau du réticulum endoplasmique. Les deux parties ( $\text{Ca}_v\alpha 2$  et  $\text{Ca}_v\delta$ ) se rejoignent ensuite en formant le pont disulfure (Klugbauer et al. 1999). La protéine produite est d'environ 175 kDa. Initialement, il était accepté que l'ancrage de la sous-unité  $\delta$  se fasse à travers un segment transmembranaire (Klugbauer et al. 1999). Cependant, des études proposent d'un ancrage à la membrane cellulaire de la sous-unité  $\delta$  via une modification post-traductionnelle. Cette modification remplace le segment transmembranaire par une molécule de glycoposphatidylinositol (GPI) membranaire (Davies et al. 2010) (**Figure 1.9**).

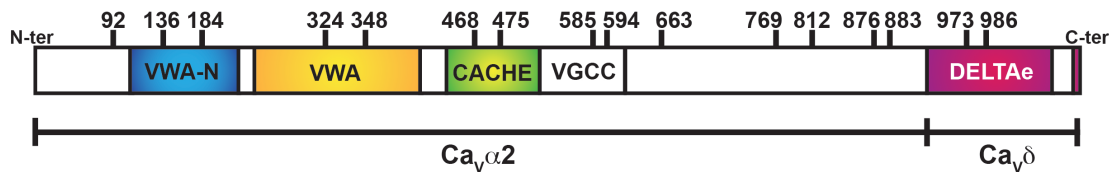
$\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  est hautement glycosylée. Le poids moléculaire prédit de la protéine est de 120 kDa, cependant une migration par électrophorèse montre la protéine à 175 kDa. Ainsi, la glycosylation de type N contribue à 50 kDa de la masse moléculaire de la protéine (Marais et al. 2001) ainsi  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  serait sujette au contrôle de qualité des glycoprotéines au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Weng et al. 2013). Toutes les isoformes de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  sont hautement glycosylées. Les sites de glycosylation de type N contenus dans l'isoforme  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  sont conservés chez l'Homme, le rat et la souris (Appendice 1). De plus, six sites de glycosylation de type N de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , soit : N184, N348, N468, N663, N876 et N986 sont conservés dans  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 2$ . Le site N348 se retrouve aussi dans l'isoforme  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 3$ .



**Figure 1.9: Modifications post-traductionnelles proposées de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ .** Afin d'obtenir la forme mature, la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  subit un clivage protéolytique suivi d'une liaison covalente S-S (pont disulfure). Le nouveau modèle montre le remplacement du segment transmembranaire de la sous-unité  $\text{Ca}_v\delta$  en une molécule de glycophosphatidylinositol (GPI) membranaire servant de point d'ancrage (figure inspirée de Davies, Kadurin et al. 2010).

Cette sous-unité possède plusieurs domaines structuraux conservés (**Figure 1.10**). Le domaine du facteur von Willebrand de type A (VWA) a été identifié par homologie de séquence dans la partie extracellulaire de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ . Il contient 200 acides aminés qui sont retrouvés dans plusieurs intégrines et laminines (Whittaker et al 2002). Ce domaine possède un site de liaison d'un ion métallique divalent (motif MIDAS) qui favorise l'interaction entre le domaine VWA et son ligand. Ce site pourrait jouer un rôle dans les changements conformationnels qui sous-tendent l'ouverture et la fermeture du canal (Davies et al, 2007). La mutation du site MIDAS diminue les courants calciques de  $\text{Ca}_v2.2$  (Canti, 2005). Ce domaine possède le site de la liaison de la gabapentine. La gabapentine est un médicament antiepileptique (Welty et al. 1993) qui se lie sur le motif RRR des sous-unités  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  et  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 2$ . Plus précisément, la mutation de l'arginine (R) 217 abolit la liaison de la gabapentine (Wang et al 1999). Un domaine VWA-N (Barclay et al. 2001) se retrouve en N terminal de la protéine. Ce domaine est habituellement présent dans les protéines contenant les domaines VWA et Cache. Le domaine Cache est hautement conservé dans toutes les isoformes de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ . Il est adjacents au domaine VWA et a été identifié suite à son homologie avec

un domaine extracellulaire présent dans plusieurs récepteurs bactériens (Anantharaman et Aravind, 2000) qui lie de petits ligands comme des acides aminés. Finalement, le domaine VGCC est un domaine retrouvé dans les canaux calciques voltage-dépendant neuronaux (Brust et al. 1993).



**Figure 1.10. Les différents domaines et les sites de glycosylation de type N de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .** Les domaines VWA-N, VWA, Cache et VGCC sont hautement conservés dans les différents isoformes de cette sous-unité. Ce premier contiendrait le site de liaison de la gabapentine. Le domaine DELTAe représente la sous-unité  $\text{Ca}_v\delta$ . Il y a 16 sites potentiels de glycosylation de type N sur l'isoforme  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .

Cette sous-unité module l'amplitude des courants, ainsi que les propriétés d'activation et d'inactivation. Le mécanisme moléculaire derrière ces effets n'est toujours pas élucidé, par contre il a été démontré que l'expression membranaire de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  avec  $\text{Ca}_v1.2$  et  $\text{Ca}_v\beta 3$  permet d'obtenir un flux net de  $\text{Ca}^{2+}$  plus élevé à travers les canaux calciques de type L, soit un maximum de densité de courant de  $-56 \pm 3$  pA/pF par rapport à  $-5 \pm 1$  pA/pF en absence de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (Bourdin et al. 2015). L'isoforme  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  est codée par le gène CACNA2D1 qui est exprimé dans les muscles squelettiques et les muscles cardiaques. La protéine est principalement associée avec le canal  $\text{Ca}_v1.2$  (Marais 2001). La co-expression de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  avec le complexe  $\text{Ca}_v\beta/\text{Ca}_v\alpha 1$  augmente la densité de courant et déplace l'activation vers des voltages plus négatifs (Bourdin et al, 2015).

#### 1.2.6.4.2 Rôle de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$

La coexpression de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  avec les canaux HVA ( $\text{Ca}_v1$  et  $\text{Ca}_v2$ ) montre une augmentation des courants et une modification des paramètres biophysiques tels que l'inactivation à des voltages hyperpolarisants, une augmentation des cinétiques d'inactivation et une augmentation dans le couplage d'ouverture des canaux (Gurnett et al., 1996, 1997; Qin et al., 1998; Wakamori et al., 1999; Barclay et al., 2001; Brodbeck et al., 2002; Klugbauer et al., 2003; Yasuda et al., 2004; Cantí et al., 2005; Tuluc et al.,

2007). Des souris transgéniques n'exprimant pas cette sous-unité montre une fonction cardiaque compromise et de plus petite densités de courant calcique (Fuller-Bicer et al., 2009). La densité de surface de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  est corrélée avec la densité de courant calcique (Bourdin et al 2015). Des études montrent un effet synergique de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  et  $\text{Ca}_v\beta$  sur les densité de courant pour différents sous-type de canal (Yasuda et al. 2004).

$\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  associé avec le canal  $\text{Ca}_v 1.1$  dans les muscles squelettiques joue un rôle dans l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  lors du couplage d'excitation (Obermair et al. 2005). Dans les souris ne possédant pas cette sous-unité, les courants calciques sont diminués dans certains types de cellule. La sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  augmente l'expression à la membrane plasmique de  $\text{Ca}_v 2$  (Cassidy et al. 2014) montrant que cette sous-unité est importante pour l'adressage du complexe. Cet effet est cependant dépendant de la présence de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$ . De plus, un «knockdown» de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , à l'aide de short hairpin ARN, réduit l'expression à la membrane de  $\text{Ca}_v 1.2$  dans les cellule du muscle lisse (Bannister et al. 2009) et  $\text{Ca}_v 2.1$  dans les boutons synaptiques (Hoppa et al. 2012). Bien que les canaux de type T ( $\text{Ca}_v 3$ ) s'expriment sans la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ , une seule étude a montré une petite augmentation de son expression (Dolphin et al. 1999) en présence de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  donc il est possible que l'adressage et la fonction des canaux  $\text{Ca}_v 3$  soit contrôlé par l'expression des sous-unités auxiliaires.

Cette sous-unité possède des similarités avec plusieurs protéines présentes dans la matrice extracellulaire et importante dans les interactions protéine-protéine (Whittaker and Hynes, 2002).  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  interagit avec la thrombospondins et joue un rôle structural dans la formation des synapses (Eroglu et al., 2009).

#### *1.2.6.4.3 Pathologies associées avec $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$*

Plusieurs pathologies sont associées avec des mutations génétiques de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ . Des mutations de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  sont associées à des arythmies cardiaques telles que le syndrome de Brugada et le syndrome de QT court. Les mutations D550Y, S709N, S755T, Q917H et S956T de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  ont été associées avec l'arythmie congénitale, soit le syndrome de QT court 6 (SQT6) (Burashnikov et al., 2010; Antzelevitch et al., 2007). Il a été démontré que les mutations D550Y, S709N et D550Y/Q917H altèrent significativement la densité de surface de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  et diminuent

grandement la densité de courant du canal  $\text{Ca}_v1.2$ . (Bourdin et al. 2015).  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  est aussi impliquée dans la perte de cellules neuronales dans l'épilepsie (Nieto-Rostro et al. 2014) et dans la douleur neuropathique (Newton et al. 2001).

Les mutations de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha2\delta2$  exprimée principalement dans le cerveau sont associées avec l'épilepsie et l'ataxie cérébelleuse (perte de coordination) (Zamponi 2015).  $\text{Ca}_v\alpha2\delta3$  quant à elle est impliquée dans le processus de douleur (Neely et al., 2010) et dans les troubles auditifs (Pirone et al. 2014). Des mutations dans  $\text{Ca}_v\alpha2\delta4$  conduisent à une dysfonction des photorécepteurs qui est associée avec la cécité nocturne (Wycisk et al. 2006a,b).

Toutes les isoformes de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  peuvent être affectées par des mutations qui mènent à des désordres psychiatriques tels que la schizophrénie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014) et l'autisme (Iossifov et al. 2012).

### **1.3 Les modifications post-traductionnelles de $\text{Ca}_v\alpha2\delta$**

Les dernières décennies ont démontré que le protéome humain est plus complexe que le génome humain. Pour 20 000 à 25 000 gènes (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) plus d'un million de protéines (Jensen 2004) sont produites. Ceci s'explique entre autre par le fait qu'un seul gène code pour plusieurs protéines différentes. Cependant, la complexité du protéome par rapport au génome est aussi due aux modifications post-traductionnelles. Ces modifications jouent un rôle important dans la fonction protéomique, car elles régulent l'activité, la localisation et l'interaction avec d'autres molécules cellulaires (protéines, acides nucléiques, lipides, co-facteurs) (Deribe et al. 2010).

Les modifications post-traductionnelles des protéines augmentent la diversité des fonctions en additionnant de façon covalente un groupe fonctionnel, en effectuant un clivage protéique d'une sous-unité ou en dégradant complètement une protéine. L'analyse des protéines et de leur modification post-transcriptionnelle est particulièrement importante pour l'étude de maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies neurodégénératives et le diabète.

Ces modifications impliquent la plupart du temps une activité enzymatique.

Environ 5% du protéome (Walsh C. 2006) est constitué d'enzymes qui permettent plus de 200 types de modifications post-traductionnelles. Ces enzymes sont des kinases, des phosphatases, des transférases et des ligases qui ajoutent ou enlèvent des groupes fonctionnels, des protéines, des lipides ou des sucres sur les chaînes d'acide aminés ou encore des protéases clivent des liens peptidiques à des sites spécifiques. D'autre part, plusieurs protéines peuvent se modifier elles-mêmes à l'aide d'un domaine autocatalytique.

Les modifications post-traductionnelles peuvent se produire à n'importe quel moment de la vie de la protéine. Plusieurs protéines sont modifiées au moment de leur traduction ou peu de temps après afin de procurer un bon repliement, une stabilité ou définir leur localisation (noyau, membrane). Par la suite, d'autres modifications sont effectuées pour activer ou inactiver des processus biologiques. Les protéines sont souvent modifiées par la combinaison de clivage et additions de groupes fonctionnels lors la maturation/activation de celles-ci. Les modifications peuvent être réversibles selon leur nature.

Voici quelques exemples de modification post-transcriptionnelle (**Figure 1.11**):

- La phosphorylation qui est une modification réversible qui ajoute un groupement phosphate sur une sérine, thréonine ou tyrosine (Cohen, 2000) est la modification la mieux étudiée. Elle joue un rôle dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires dont le cycle cellulaire, la croissance, l'apoptose et la signalisation transductionnelle.
- La glycosylation est une des modifications majeures qui joue un rôle important pour le repliement de la protéine, sa conformation, sa localisation, sa stabilité et son activité (Lodish, 2000). La glycosylation ajoute une chaîne de sucre sur une asparagine (type N) ou une sérine ou thréonine (type O) sur une majorité des protéines présentes à la membrane cellulaire ou sécrétées. L'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) fait aussi partie de cette famille de modifications.

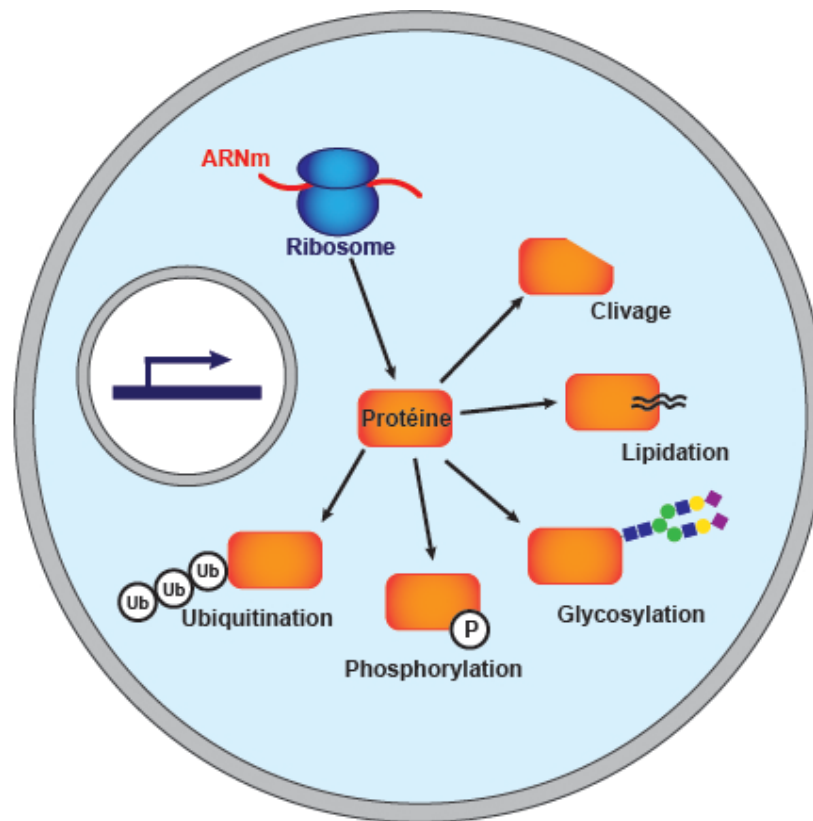
- L'ubiquitination est l'ajout de 76 amino-acides sur une lysine de la protéine cible via la glycine en C-terminal de l'ubiquitine (Nath et al. 2009). La protéine modifiée sera par la suite reconnue par le protéasome 26S ce qui catalysera la dégradation de la protéine ubiquitiné et le recyclage de l'ubiquitine.
- La lipidation est l'ajout de chaîne lipidique sur une protéine permet le ciblage de cette protéine à différentes organelles (RE, appareil de Golgi), vésicules (endosomes, lysosomes) ou à la membrane plasmique (Nadolski, 2007). Il en existe quatre types soit ; la N-myristoylation, la S-myristoylation, la S-prenylation et la S-palmitoylation. Chaque modification permet une affinité distincte pour une membrane en particulier. Elle augmente l'hydrophobicité de la protéine donc augmente son affinité pour les membranes lipidiques. Plusieurs lipides peuvent se lier sur la même protéine.
- Les protéases permettent le clivage un lien peptidique à l'intérieur d'une protéine. Ce processus est critique pour l'apprêtement de l'antigène, l'apoptose et la signalisation cellulaire. Elles sont classées selon la nature leur site actif : sérine, acide aspartique, cystéine ou zinc.

### 1.3.1 La glycosylation

Une des modifications post-traductionnelles la plus répandue est la glycosylation. La glycosylation est une réaction enzymatique post-traductionnelle ou co-traductionnelles permettant de lier de façon covalente un glucide à une chaîne de peptides, à une protéine, à un lipide ou à d'autres molécules (Lodish, 2000). Cette modification rend les protéines plus résistantes à la protéolyse. Les protéines membranaires ainsi que les protéines sécrétées sont majoritairement glycosylées. La destination et la fonction des protéines peuvent varier selon les sucres ajoutés.

Chez les eucaryotes, il existe de nombreux types de glycosylations classées en fonction de l'identité de l'atome de l'acide aminé qui se lie à la chaîne carbonée. Des défauts dans la glycosylation de type N, la glycosylation de type O et l'ancre GPI sont souvent impliqués ou responsables de maladies liées à un défaut de glycosylation.





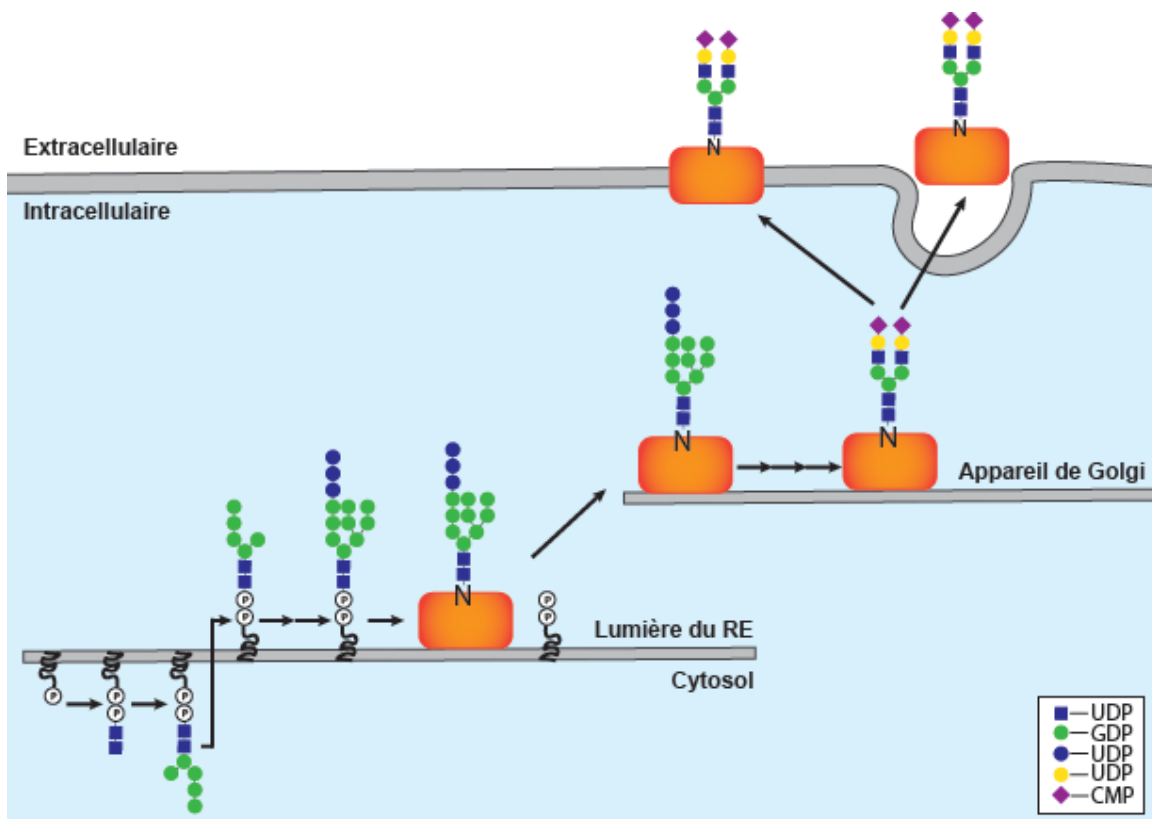
**Figure 1.11. Synthèse protéique et modifications post-traductionnelles.** Suite à leur synthèse via l'ARNm et les ribosomes, les protéines sont modifiées dans le but de réguler leur activité, leur localisation et leurs interactions avec d'autres molécules cellulaires. La phosphorylation ajoute un groupement phosphate sur une sérine, thréonine ou tyrosine. La glycosylation ajoute une chaîne de sucre. L'ubiquitination ajoute des ubiquitines qui donnent le signal de dégradation par les protéasomes. La lipidation permet l'ajout d'une chaîne lipidique. Les protéases permettent le clivage de lien peptidique d'une protéine.

Les maladies liées à la glycosylation sont dues à des mutations sur les gènes impliqués dans le métabolisme des sucres. Une déficience en mannose-6-phosphate isomérase ne permet pas la glycosylation de type N complète d'une protéine (Freeze 2013). La dystrophie musculaire congénitale est affectée pour la voie de biosynthèse qui ajoute au glycan le O-mannose (Freeze 2013). De plus, l'enzyme mutée, qui permet la N-acétylation dans la formation de l'ancre GPI, cause le Syndrome CHIME (ocular Coloboma, Heart defects, Ichthyosis, Mental retardation ans Ear anomalies) (Freeze 2013). Une déficience dans la glycosylation des canaux ioniques cardiaques joue un rôle important dans plusieurs pathologies du cœur comme les arythmies cardiaques (Park et al. 2003) et les syndrômes de Jervell et Lange-Nielsen (KCNE1) (Schulze-Bahr, 1997).

Ainsi en connaissant mieux les voies de glycosylation, il est possible de trouver des cibles potentielles de thérapie.

### 1.3.1.1 La glycosylation de type N

La glycosylation de type N (**Figure 1.12**) survient dans le réticulum endoplasmique (RE) durant ou suite à la synthèse de nouvelles protéines. L'activation de la glycosylation débute à l'aide d'une série de précurseurs qui fournit les trois sucres permettant la construction d'un glycan glucose<sub>3</sub>-mannose<sub>9</sub>-N-acetylglucosamine<sub>2</sub> (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>): uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), guanosine diphosphate mannose (GDP-Man), dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man) et dolichol phosphate glucose (Dol-P-Glc). Le glycan est formé sur un dolichol incorporé dans la membrane du réticulum endoplasmique (Stanley et al. 2009).



**Figure 1.12. La glycosylation de type N.** L'ajout de sucres est effectué à l'aide de guanosine-diphosphate, uridine-diphosphate et cytidine-mono-phosphate lié aux différents sucres. La glycosylation de type N débute dans le réticulum endoplasmique en ajoutant le glycan suivant : Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Des modifications de la chaîne sont effectuées dans l'appareil de Golgi afin d'obtenir un signal de la localisation (membrane

cellulaire ou sécrétion) plus précis. Les carrés bleus correspondent aux sucres N-acetylglucosamine, les ronds verts aux mannoses, les ronds bleus aux glucoses, les ronds jaunes aux galactoses et les losange violets aux acides sialiques.

L'oligosaccharide lié au lipide de la membrane du RE est par la suite transféré en bloc sur une asparagine de la séquence consensus asparagine, acide aminé X, sérine ou thréonine (NX(S/T)) des protéines assujetties à la glycosylation. L'acide aminé X ne peut être une proline, une sérine ou une thréonine. Cette chaîne est remodelée en clivant les glucoses et un nombre variable de mannose dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Par la suite, il y a addition de GlcNAc, galactose (Gal), fucose (Fuc) et d'acide sialique dans l'appareil de Golgi. De plus, certains glycans de type N reçoivent aussi des sulfates et des phosphates (Freeze 2009). Les glycoprotéines sont alors envoyées à leur destination finale : la surface de la cellule ou sécrétées dans le milieu extracellulaire.

#### **1.3.1.2 La glycosylation de type O**

La glycosylation de type O permet une modification de résidus sérine ou thréonine à l'aide du dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man) et du complexe POMT1-POMT2 (protein-O-mannosyltransferase 1 et 2) afin d'ajouter des mannoses (Muntoni 2008). L'addition de GlcNAc, de galactose (Gal) et d'acide sialique permet d'obtenir une structure relativement peu complexe. Quelques chaînes sont phosphorylées afin d'obtenir des mannose-6-phosphate (Man-6-P) (Inamori 2012). Les conditions préalables de la structure du glycan, l'ordre d'ajout des sucres et les substrats ne sont pas encore précisément définis.

#### **1.3.1.3 L'ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI)**

L'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) est assemblée graduellement sur un phosphatidylinositol situé à la membrane du réticulum endoplasmique (Ferguson 2009). Tout d'abord, un GlcNAc est transféré sur un phosphatidylinositol par un complexe protéique (PIG-A) à la surface extérieure du RE. Une N-acétylation se produit avant de se retrouver sur la membrane luminale du RE. Plusieurs additions et clivages de sucres sont effectués dans le RE. L'ancre GPI est par la suite transférée sur la protéine contenant la séquence appropriée d'acides aminés en C-terminal. Ce C-terminal inclut en

majorité 8 à 20 acides aminés hydrophobes et est précédé d'une région hydrophile de 8 à 12 acides aminés riches en acides aminés chargés et en proline (White 2000). La protéine avec l'ancre GPI est transportée vers l'appareil de Golgi (Ferguson 2009). L'ancre GPI liée à la protéine rejoint la glycopingolipide et le cholestérol afin de former un radeau lipidique à la surface de la cellule (Fujita 2012).

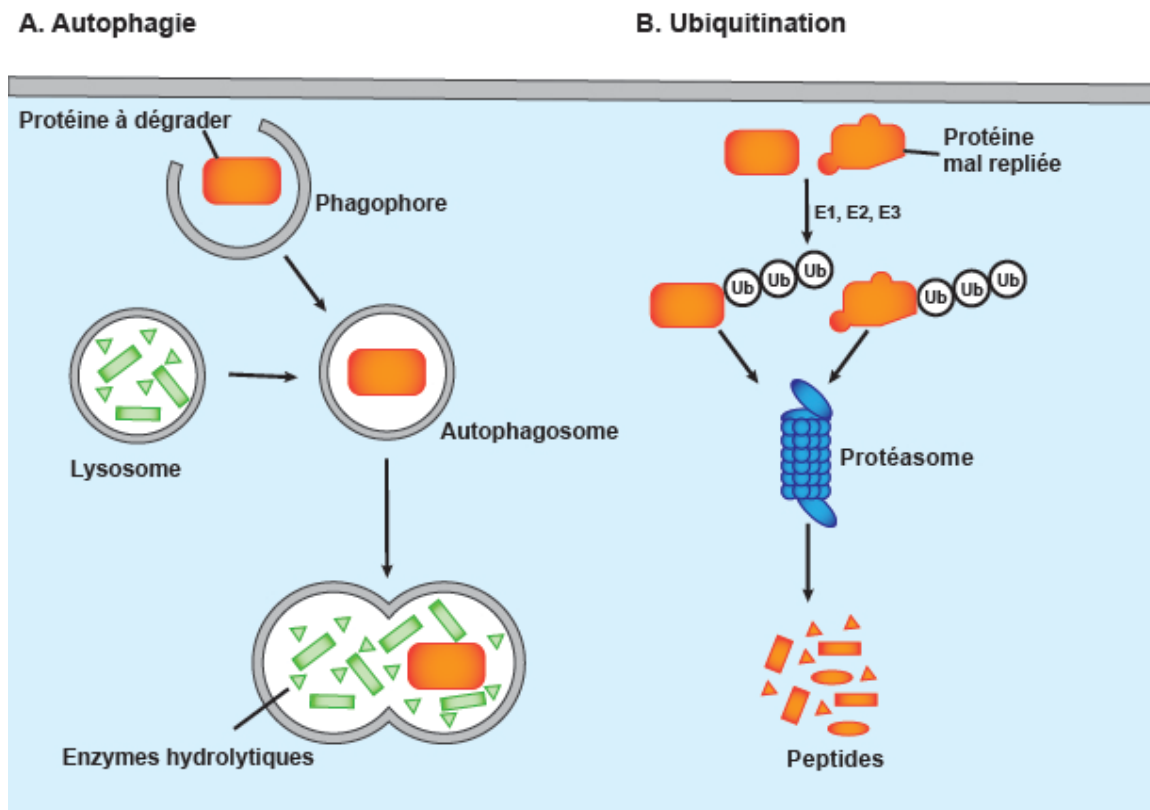
## **1.4 Le système de dégradation des protéines**

L'équilibre finement régulé entre la synthèse et la dégradation des protéines permet de contrôler l'homéostasie cellulaire. La synthèse de protéines entraîne un coût énergétique élevé. La dégradation de protéines en petits peptides, permettant le recyclage des acides aminés, aide donc à maintenir l'équilibre énergétique de la cellule. La dégradation permet également de contrôler la qualité des protéines puisque les protéines anormales ou endommagées vont être reconnues et dégradées. Deux grandes voies de dégradation sont décrites pour les protéines cellulaires (**Figure 1.13**). Premièrement, l'autophagie dégrade les organites et les protéines de longue durée de vie (Temps de demi-vie ( $T_{1/2}$ ) > 5 heures (Ohsumi, 2001)) qui se retrouvent à la membrane, dans le milieu extracellulaires et dans le cytosol. Deuxièmement, le système ubiquitine-protéasome qui permet la dégradation de 80-90% des protéines cytosoliques et nucléaires de courte durée de vie ( $T_{1/2}$  < 5 heures (Hamilton et al. 2000)). L'ubiquitination d'une protéine est nécessaire pour sa dégradation dans le protéasome. La voie dépendante aux caspases contribue aussi à la dégradation des protéines ubiquitinées, cependant ce système est principalement impliqué dans la dégradation des protéines lors de l'apoptose (Lecker et al. 2006).

### **1.4.1 L'autophagie**

L'autophagie est un processus d'auto-dégradation des composants cellulaires. Elle permet l'équilibre entre la synthèse, la dégradation et le recyclage des composants cellulaires (Lin et al 2013). L'autophagie est régulée par l'augmentation d'un signal de stress tel que la diminution de facteur de croissance, le stress au niveau du réticulum endoplasmique ou par une infection extra ou intracellulaire (He et al. 2009). Il existe trois classes d'autophagies distinguées par la façon dont les substrats protéiques atteignent la lumière du lysosome: la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie

dépendante des chaperonnes. La macroautophagie, généralement appelée autophagie, est la plus répandue. Il y a formation d'une vésicule à double membrane appelée autophagosome qui séquestre les organites ou des parties de cytosol. L'autophagosome fusionne par la suite avec les lysosomes primaires ou les endosomes tardifs (Lamb et al 2013). L'hydrolase acide, enzyme caractéristique des lysosomes, dégrade alors le contenu cellulaire (He et al 2009). La microautophagie permet la dégradation directe par les lysosomes qui absorbent directement les constituants cytosoliques (Mortimore 1983).



**Figure 1.13. Les deux voies de dégradations des protéines. A.** L'autophagie permet la dégradation des protéines via les lysosomes. Ceux-ci possèdent des enzymes hydrolytiques qui permettent de dégrader les protéines. **B.** L'ubiquitination consiste à l'ajout d'ubiquitine sur des protéines ce qui agit comme signal de dégradation pour les protéasomes.

L'autophagie nécessite parfois des chaperones qui se lient à des protéines contenant le motif pentapeptique KFERQ (Bejarano 2010). Les chaperones se lient par la suite au récepteur LAMP-2A à la membrane du lysosome et permettent la translocation

de la protéine cible dans le lysosome (Bejarano 2010). L'autophagie est généralement considérée comme un système de dégradation non sélectif (Kraft et al 2010). Elle permet la dégradation de façon aléatoire des organelles et des protéines qui possèdent un temps de demi-vie plus long (Kraft et al 2010).

Plusieurs études ont démontrées qu'une lacune du système d'autophagie amène à une accumulation de protéines anormales et des organelles défectueux. Ceci conduit à de mauvaise fonction cellulaire et souvent à l'apoptose (Bejarano 2010). L'autophagie joue un rôle critique dans plusieurs maladies, dont les maladies cardio-vasculaires (Nishida et al 2009).

#### **1.4.2 L'ubiquitination**

Le système ubiquitine-protéasome se distingue de l'autophagie car il permet une reconnaissance spécifique des protéines ubiquitinées (Mizushima 2007). L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine qui permet la régulation du transport et la dégradation des protéines par les protéasomes (Mani 2005). Les ubiquitines sont des protéines hautement conservées de 76 acides aminés ( $\approx 8$  kDa) (Ciechanover et al. 2004). Ces protéines catalysent des modifications post-transductionnelles par une cascade enzymatique. L'Ub joue aussi un rôle dans le ciblage des protéines vers leur dégradation par le protéasome 26S (Glickman 2002). Trois enzymes sont impliquées dans la cascade, l'ubiquitine E1 qui active la cascade à l'aide de l'ATP en permettant la formation d'une adénylate ubiquitine, l'Ub E2 qui permet la conjugaison de l'Ub avec une protéine de transport et l'ubiquitine ligase E3 qui lie l'Ub sur la lysine de la protéine cible (Ciechanover 2004). L'ubiquitine est conjuguée sur les protéines par la formation d'une liaison isopeptidique qui lie le groupe carboxyle de la glycine de l'Ub et au groupe amine de la lysine de la protéine substrat. La mono-ubiquitination ne permet pas la dégradation d'une protéine, mais permet la régulation de son adressage membranaire, la transcription des gènes, la réparation et la réplication d'ADN (Chen et al 2009). Lorsqu'il y a une polyubiquitination, la conjugaison se fait entre le groupe carbonyle de la glycine de l'Ub et le groupe amine de l'une des sept lysines (K) de l'ubiquitine précédente ce qui permet de former une chaîne d'ubiquitines successives, ainsi une chaîne se forme (Kirisako 2006). La polyubiquitination liée à la lysine 48 de l'ubiquitine permet le signal primaire pour la dégradation par le protéasome 26S (Kirisako 2006).

L'ubiquitine liée à la protéine cible est reconnue par le protéasome 26S, un complexe multicatalytique de protéases, qui dégrade la protéine en petits peptides par l'hydrolyse de l'ATP (Lecker 2006). Le protéasome 26S est composé du complexe 20S qui forme le complexe central du protéasome et du complexe 19S qui est à chaque extrémité de celui-ci (Glickman 2002). La protéine ubiquitinée entre dans le complexe 19S qui isole la protéine de la protéolyse et prévient ainsi la dégradation non spécifique des protéines (Lecker 2006). La chaîne de polyubiquitination est alors clivée par les isopeptidases du complexe 19S (Glickman 2002). Les ubiquitines sont par la suite réutilisées dans la dégradation d'autres protéines (Glickman 2002). Le complexe 19S contient également 6 ATPases homologues qui en se liant à la protéine déubiquitinée changent sa conformation et ainsi permettent son entrée dans le complexe 20S (Benaroudj et al. 2003). Le complexe 20S contient différents sites de clivage qui permettent la dégradation des protéines en petits peptides (Benaroudj et al. 2003). Les peptides formés et transportés dans le cytosol sont immédiatement digérés par les endopeptidases et les aminopeptidases (Kisselev et al. 1999). Les acides aminés sont ensuite utilisés pour la synthèse de nouvelles protéines ou pour le métabolisme énergétique (Reits 2004). Il est à noter que le protéasome 26S catalyse la dégradation de certaines protéines non ubiquitinées, mais l'importance de cette activité n'est pas connue *in vivo* (Goldberg 2003).

## 1.5 Hypothèses et Objectifs

Ca<sub>v</sub>α2δ1 des canaux calciques Ca<sub>v</sub>1.2 influence l'amplitude des courants et les propriétés d'activation et d'inactivation. La co-expression de la sous-unité Ca<sub>v</sub>α2δ avec le complexe Ca<sub>v</sub>β/Ca<sub>v</sub>α1 augmente la densité de courant et déplace l'activation vers des voltages plus négatifs (Bourdin et al, 2015). Il a été démontré que l'expression membranaire de Ca<sub>v</sub>α2δ1 stimule un flux net de Ca<sup>2+</sup> à travers les canaux calcique de type L (Bourdin et al. 2015). Il y aurait une corrélation entre la densité à la membrane de la sous-unité Ca<sub>v</sub>α2δ1 et la densité de courant calcique. Le mécanisme moléculaire qui permet cette modulation n'est toujours pas élucidé.

La glycosylation de type N permet de maintenir la protéine dans une certaine stabilité et agit comme signal de localisation pour les protéines membranaires et les protéines sécrétées. Les mécanismes qui sont responsables de l'adressage membranaire de Ca<sub>v</sub>α2δ sont peu connus. Cette protéine possède 16 sites potentiels de glycosylation de type N qui sont conservés pour la plupart dans les différentes isoformes. Dans l'optique où l'adressage membranaire de Ca<sub>v</sub>α2δ détermine la fonction du canal, il est important de mesurer le rôle de la glycosylation et d'identifier les sites Asn qui sont déterminants.

Une étude par mutagenèse dirigée des sites de glycosylation couplée avec des méthodes de fluorescence nous a permis de vérifier cette hypothèse, avec l'aide de la construction mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ-HA, où le fluorophore mCherry permet de détecter la protéine exprimée dans la cellule et où un épitope HA extracellulaire permet de quantifier la présence de la protéine à la membrane avec un anticorps anti-HA couplé au fluorophore FITC. La stabilité de la protéine Ca<sub>v</sub>α2δ en absence de glycosylation a été élucidée suite à une cinétique de dégradation. De plus, la technique de patch-clamp a permis de vérifier la fonction des protéines en mutant un ou plusieurs sites potentiels de glycosylation.



## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Technique de biologie moléculaire

Tableau 2.1: Les différentes sous-unités utilisées.

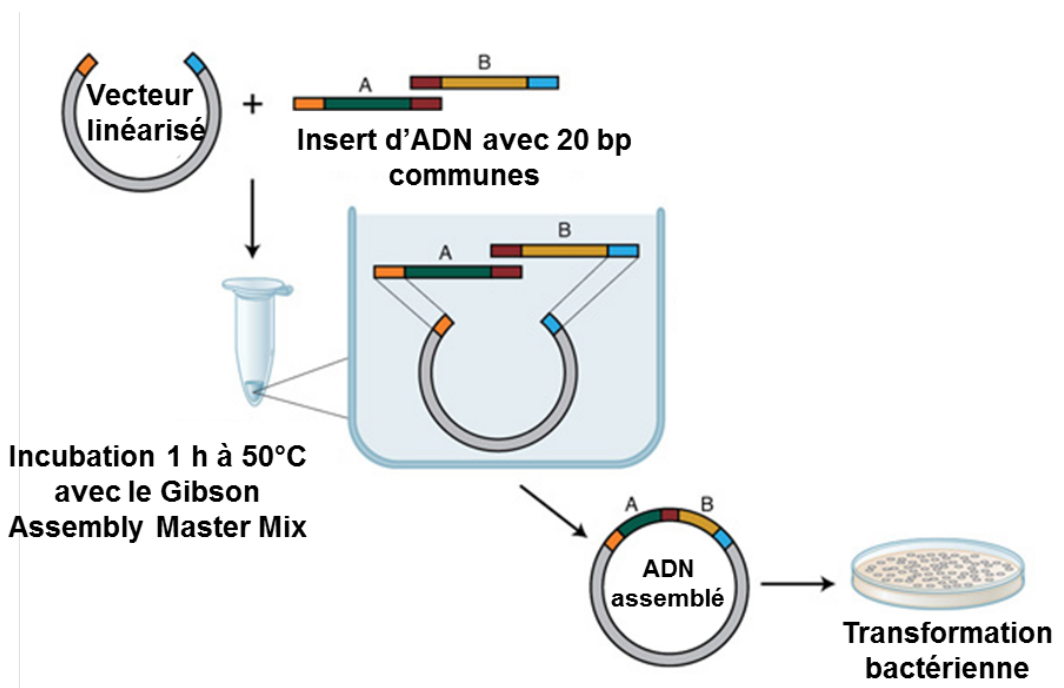
| Sous-unité            | Numéro GenBank™ | Espèce | Vecteur     | Antibiotique de sélection |
|-----------------------|-----------------|--------|-------------|---------------------------|
| Ca <sub>v</sub> 1.2   | X15539          | Lapin  | pCMV-Tag5A  | Kanamycine                |
| Ca <sub>v</sub> α2δ-1 | NM_012919       | Rat    | pmCherry-N1 |                           |
| Ca <sub>v</sub> β3    | M88751          | Rat    | pCMV-Tag5A  |                           |

#### 2.1.1 Mutagénèse dirigée

Les mutations simples introduites dans la sous-unité Ca<sub>v</sub>α2δ1 ont été effectuées par la technique de mutagénèse dirigée « Polymerase Chain Reaction » (PCR) à l'aide de la trousse Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs (NEB), Whitby, Ontario, Canada). La réaction contient l'ADN (25 ng), les amorces et le Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master mix. L'outil NEBChanger a été utilisé afin d'obtenir les amorces contenant les mutations voulues. Les amorces sens et anti-sens ont été conçues avec la mutation au milieu du fragment (Invitrogen, Carlsbad, CA) afin que le bout 5' des deux amorces soit dos à dos. Suite à la PCR, un mélange d'enzyme kinase/ligase/Dpn1 (KLD) de la trousse a été ajouté à l'ADN amplifié afin de dégrader l'ADN parental méthylé et hémiméthylé. Ce processus dure 5 min. Le produit de PCR a été ensuite vérifié sur gel d'agarose 1% (m/v, solubilisée dans une solution de tampon Tris-acétate 10 mM, EDTA 1 mM) dans le but de s'assurer de l'intégrité et du poids moléculaire de l'ADN. Tous les gels contiennent l'intercalant bromure d'éthidium qui permet de visualiser les bandes formées par l'ADN en présence de lumière ultraviolette (UV).

Afin d'obtenir plusieurs mutations à la fois, la technique d'assemblage de Gibson a été utilisée (**Figure 2.1**). Cette technique permet d'assembler plusieurs fragments d'ADN qui ont été amplifiés. La bonne conception des amorces est essentielle pour le bon fonctionnement de la méthode. Les amorces de 30 à 35 paires de base doivent avoir 20 paires de base identiques contenant la mutation. Une réaction PCR a été générée pour obtenir les fragments d'ADN voulus. Les échantillons ont été déposés sur gel d'agarose 1% et les bandes correspondantes aux fragments ont été extraites à l'aide de la trousse

QIAquick® Gel extraction kit (Qiagen, Mississauga, Ont). La ligation de Gibson a été effectuée avec l'ajout de 10 µL de Gibson Assembly Master Mix (2X) (New England Biolabs, Whitby, Ontario, Canada) aux 0,05 pmol de chacun des fragments. Ce mix contient une exonucléase 5', une ADN polymérase et un ADN ligase. La réaction s'effectue à 50°C pour une durée d'une heure.



**Figure 2.1. Technique d'assemblage de Gibson.** (Figure modifiée de New England Biolabs)

Le produit d'une simple mutagenèse suite à la digestion KLD ou de l'assemblage de Gibson a été ensuite amplifié par des bactéries 5-alpha Competent *E. coli* (Subcloning Efficiency) fournies avec la trousse Q5® site directed mutagenesis kit (New England Biolabs, Whitby, Ontario, Canada). Les bactéries ont été décongelées sur glace. L'ADN a été ajouté aux bactéries et le mélange a été incubé pendant 30 min sur glace. Par la suite, un choc thermique de 30 secondes à 42 °C a été réalisé. Le milieu SOC Outgrowth Medium de la trousse Q5® site directed mutagenesis kit (New England Biolabs, Whitby, Ontario, Canada) a été ajouté. Le tout est mis à incuber sous agitation pendant une heure à 37°C. Le produit final a été étalé sur un pétri contenant du LB Agar (sigma-Aldrich, St-Louis, MO) avec l'antibiotique de sélection approprié. Tous les vecteurs

utilisés pour cette étude sont résistants à l'antibiotique kanamycine. Les pétris ont incubés de 16 à 18 heures à 37°C.

Suite à l'incubation, quatre à six colonies bactériennes ont été repiquées séparément dans du milieu LB avec la kanamycine (50mg/mL). Ce mélange incube sous agitation pendant 16 à 18 heures à 37°C. Ceci permet l'amplification de l'ADN qui est ensuite extrait à l'aide de la trousse QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Mississauga, Ont). Les clones obtenus ont été par la suite séquencés (plateforme génomique, IRIC, Montréal). Le clone contenant la mutation désirée a été alors sélectionné pour soit subir une deuxième étape de mutagénèse ou pour être amplifié par des bactéries compétentes DH5α (Life Technologies Inc. Burlington, ON). Pour ce dernier, l'ADN a été ajouté aux bactéries et le mélange a été incubé sur glace pour 30 minutes suivi d'un choc thermique de 30 secondes à 42°C. Du milieu de culture LB Broth (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) a été ajouté au mélange et incubé sous agitation une heure à 37°C. Le produit final a été étalé sur un pétri contenant du LB Agar avec l'antibiotique de sélection approprié. Les bactéries incubent entre 16 et 18 heures à 37°C.

Une ou plusieurs colonnies ont été repiquées dans le milieu LB avec l'antibiotique de sélections kanamycine (50 mg/mL). Une incubation de 16 à 18 heures à 37°C sous agitation permet d'amplifier l'ADN qui est extrait par la suite à l'aide de la trousse QIAfilter™ Plasmid Midi kit (Qiagen, Mississauga, Ont). L'ADNc concentré sous forme de plasmide est dosé (260nm) et transfecté dans des cellules HEKT.

### **2.1.2 Insertion du HA**

L'hémagglutinine HA («human influenza hemagglutinin») est un peptide avec la sequence primaire suivante: YPYDVPDYA. L'insertion de cet épitope dans des protéines d'intérêt permet de les visualiser par des méthodes d'immunohistochimie. Afin de permettre la quantification de Ca<sub>v</sub>α2δ1 à la membrane cellulaire, l'épitope a été inséré du côté extracellulaire de la protéine qui a été sous-clonée dans le plasmide mCherry-N1. L'épitope HA a été inséré à la position de l'arginine (R) 676 suite à plusieurs essais d'insertions à plusieurs endroits. Cette construction permet d'évaluer la densité à la membrane de Ca<sub>v</sub>α2δ1 par cytométrie en flux en double couleur à l'aide de l'anticorps

anti-HA couplé au FITC et du fluorophore mCherry. Cette construction, mCherry-Ca $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA, a été aussi utilisée en patch-clamp pour uniformiser les résultats.

L'insertion de l'épitope HA a été effectuée en 2013 par Dr Benoîte Bourdin par mutagenèse dirigée selon le protocole décrit précédemment.

### **2.1.3 Mutations de glycosylation de type N**

Les sites prédits de glycosylation de type N (**Tableau 2.2**) retrouvés dans la séquence primaire de Ca $\alpha$ 2 $\delta$ 1 ont été obtenus à l'aide du logiciel <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>. Les séquences consensus commençant par une asparagine (NXS/T) ont été retrouvées seize fois dans la protéine. Afin d'altérer les sites de glycosylation de type N, la mutation de l'asparagine (N) en glutamine (Q) a été effectuée. Le choix de cette substitution est basé sur la polarité de l'acide aminée.

## **2.2 Culture cellulaire et transfection des cellules**

### **2.2.1 Culture cellulaire des HEKT**

La lignée cellulaire HEK293T (ou HEKT pour «Human Emryonic Kidney-T antigen») (ATCC, Manassas, VA) a été utilisée pour les expériences de cytométrie en flux, patch-clamp, immunobuvardage et microscopie confocale. Cette lignée est appelée T car ces cellules sont transfectées avec le gène codant SV40 T-antigen (« Simian vacuolating Virus 40 »). Cette protéine permet la réplication épisomale de plasmides transfectés qui contiennent l'origine de réplication SV40. Ceci permet d'amplifier des plasmides et d'exprimer des gènes d'intérêts par les cellules HEKT.

Les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de pétri pour culture cellulaire (100 mm x 20 mm) (Corning incorporated, Lowell, MA), contenant 10 mL de milieu de culture. Le milieu de base est composé du milieu DMEM-HG (« Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose ») (Invitrogen, Burlington, ON) additionné de 10% de FBS-HI (« Fetal Bovine Serum Heat inactivated ») (Origine : États-Unis ; Invitrogen, Burlington, ON) et de penstrep composé de pénicilline (10 unités/mL) ainsi que de streptomycine (10  $\mu$ g/mL). Les antibiotiques permettent d'éviter les risques de contamination bactérienne des échantillons. L'antibiotique de sélection généticine (Geneticin® Selective Antibiotic, Invitrogen, Burlington, ON) (40  $\mu$ g/mL) a été utilisé afin de cultiver la lignée cellulaire HEKT exprimant de manière stable la sous-unité Cav $\beta$ 3.

**Tableau 2.2. Prédiction des sites de glycosylation de type N de la séquence primaire de Ca $\alpha$ 251 du rat.**

| Séquences | Probabilité | Nombre de réseau dont le pourcentage est positif |
|-----------|-------------|--|
| 92 NRSK   | 0,75        | 9/9  |
| 136 NESE  | 0,53        | 6/9  |
| 184 NWTs  | 0,64        | 9/9  |
| 324 NITA  | 0,47        | 4/9  |
| 348 NVSR  | 0,74        | 9/9  |
| 468 NVTG  | 0,63        | 8/9  |
| 475 NKTN  | 0,48        | 4/9  |
| 585 NRTY  | 0,58        | 7/9  |
| 594 NGTD  | 0,68        | 9/9  |
| 663 NNTE  | 0,54        | 5/9  |
| 769 NKSG  | 0,54        | 6/9  |
| 812 NFTK  | 0,60        | 8/9  |
| 876 NISL  | 0,68        | 9/9  |
| 883 NKSY  | 0,51        | 5/9  |
| 973 NDTK  | 0,51        | 4/9  |
| 986 NCSR  | 0,62        | 8/9  |

**Tableau 2.2.** Le serveur de <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> utilise une série de neuf réseaux artificiels qui permet de prédire les sites de glycosylation en utilisant les séquences connues pour être des sites de glycosylation et ceux qu'ils ne le sont pas. Le tableau énumère la position des sites prédits qui ont la séquence Asn-X-Ser/Thr (colonne de gauche), la probabilité d'être un site potentiel de glycosylation (colonne du centre) et le nombre de réseau prédisant que la séquence est un site de glycosylation (colonne de droite). Chaque site potentiel de glycosylation a une valeur entre 0 et 1 où la valeur au dessus de 0,5 suggère que le site est probablement glycosylé.

Cette sous-unité des canaux calciques est dans le vecteur pCMV-Tag5a qui donne la résistance à la généticine (G418).

Les cellules ont été cultivées dans des incubateurs maintenus à 37°C avec un taux de CO<sub>2</sub> de 5%. Elles ont été cultivées dans des plats de culture pendant une période maximale de trois mois ou jusqu'à concurrence de 30-40 passages. Les cellules ont été divisées lorsqu'elles atteignent une confluence de 85- 95%. Dans ce cas, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées avec du milieu trypsine-EDTA 0,05% (Invitrogen, Burlington, ON) avant d'être détachées par ce même milieu en étant incubées à 37°C pendant 5 minutes. L'ajout de milieu DMEM-HG permet de resuspendre les cellules dans un volume final de 10 mL. Les cellules ont été ensuite comptées à l'hémacymètre et ensemencées selon la densité nécessaire. Les cellules HEKT transfectées de manière stable avec la sous-unité Cavβ3 ont été cultivées constamment avec l'antibiotique de sélection généticine jusqu'à la transfection.

### **2.2.2 Transfection**

Les cellules ayant atteint 80-90% de confluence dans des boîtes de pétri de 35 mm en absence d'antibiotique sont transfectées. Les cellules ont été transfectées à l'aide de la lipofectamine (Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent, Invitrogen, Burlington, ON). L'ADNc intègre des liposomes sphériques contenus dans la solution de lipofectamine. Les liposomes fusionnent avec la membrane plasmique afin d'intégrer l'ADNc dans les cellules. Chaque plasmide a été transfecté à l'aide de 4 µg d'ADNc et seulement 0,2 µg du témoin de transfection (vecteur pEGFP) pour les expériences de « patch-clamp ». Ces ADNc ont été ajoutés à 250 µL de milieu Opti-Mem qui a été préchauffé à 37°C (Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (1X), Invitrogen, Burlington, ON). En parallèle, 10 µL de lipofectamine ont été ajoutés à 250 µL de milieu Opti-Mem pour chacune des conditions de transfections. Les deux mélanges incubent pendant 5 minutes à température ambiante. Les deux solutions ainsi obtenues ont été mélangées et incubées 20 minutes à température ambiante. Le mélange a été ajouté aux cellules en culture qui sont ensuite incubées 24 heures dans des incubateurs maintenus à 37°C avec un taux de CO<sub>2</sub> de 5%. Le marquage des cellules par le mCherry nous a permis de rapporter un efficacité de transfection qui varie de 60 à 70% dans nos expériences.

### **2.2.3 Traitement à la cycloheximide**

Après 24 heures de transfection, un changement de milieu a été effectué avec du DMEM-HG-10% FBS-HI sans antibiotique avec ajout de 100 µg/mL de cycloheximide (100mg/mL) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). La cycloheximide inhibe la biosynthèse des protéines. Ce traitement permet d'obtenir un suivi de la dégradation des protéines.

### **2.2.4 Isolation des cardiomyocytes**

Les expériences ont été approuvées par le comité de la protection animal de l'institut de cardiologie de Montréal (protocole no. 2014-44-01) et effectuées selon conseil canadien en protection des animaux en science et le guide Care and Use of laboratory Animals 8th Edition (2011). Les souris CD1 en gestation ont été obtenues par Charles River (St-Constant, Qc, Canada). L'isolation des myocytes ventriculaires de souris neonatales a été effectuée par Dre Benoîte Bourdin. Brièvement, les souris de 1 à 3 jours ont été cryoanesthésiées et tuées par décapitation. Les ventricules ont été digérées à l'aide de collagénase de type II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA). Les cardiomyocytes recueillis sont centrifugés et mis en culture à 37°C dans un incubateur avec 5% CO<sub>2</sub> pour 24 heures dans du milieu DMEM\_HG :M199 (4 :1) (Life Technologie, Burlington, ON, Canada) contenant 4% de sérum de cheval, 1% de pénicilline-streptomycine et 1 µM cytosine arabinoside (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). La cytosine arabinoside inhibe la croissance des fibroblastes, ce qui permet de favoriser la culture des cardiomyocytes.

## **2.3 Immunobuvardage de type Western**

### **2.3.1 Lysat cellulaire**

Les lysats cellulaires se font à 4 °C. Après 24 heures suite à la transfection ou à des temps fixes après traitement à la cycloheximide, les cellules ont été lavées deux fois avec du tampon PBS-CM (phosphate-buffered saline- 0,1 mM Ca<sup>2+</sup>, 1 mM magnésium) et lysées à l'aide de tampon de lyse RIPA (Radio immunoprecipitation assay) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) avec 0,001% de cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). Le lysat a été incubé sous agitation pendant 30 minutes. Le produit est ensuite centrifugé 30 minutes à 13 000 rpm (centrifugeuse de table) et le

surnameant contenant les protéines est récupéré. Les protéines ont été ensuite dosées à l'aide de la trousse BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, États-Unis) en suivant les instructions du fabricant.

### **2.3.2 Traitement à la PNGase et EndoH**

Le lysat cellulaire (20 µg) a été incubé dans des conditions dénaturantes (0,5% SDS et 40 mM DTT) puis traité avec 500 unités de peptide N-glycosidase F (PNGase) ou endoglycosidase H (Endo H) (New England Biolabs Inc., Whitby, ON , Canada) avec addition de Glycobuffer 2 et NP-40. La réaction a été incubée pour une durée de 1 heure à 37°C.

### **2.3.3 Gel SDS-PAGE**

Les protéines ont migrées à travers un gel dénaturant SDS-PAGE (« Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis ») afin de les séparer en fonction de leur masse molaire. Le gel est constitué d'un gel d'entassement 5% acrylamide/bisacrylamide suivi par un gel de séparation de 6 à 8% acrylamide/bisacrylamide. La migration se fait pendant 1 heures 30 minutes à 120 V. Les puits ont été chargés de 5 à 20 µg de protéines dans du tampon de Laemmli selon les expériences et l'expression des protéines.

### **2.3.4 Transfert**

Les protéines ont été transférées à 100 V pendant 2 heures sur des membranes de nitrocellulose (Biorad, Mississauga, Ontario). Afin d'évaluer la qualité du transfert et du chargement des protéines, la membrane a été incubée dans le rouge ponceau pour 2 minutes et rincée avec de l'eau 18,2 MΩ afin de retirer le surplus de colorant n'ayant pas interagit avec les protéines. Ce colorant interagit avec les protéines de façon réversible. Les membranes ont été ensuite incubées 30 minutes à température pièce sous agitation dans une solution de blocage composée de PBS avec 5% (m/v) de lait.



### **2.3.5 Immunobuvardage**

L'hybridation avec l'anticorps primaire anti-Ca<sub>v</sub>α2δ provenant du rat (Alomone, 1:1000) a été faite dans la solution de blocage sous agitation durant toute la nuit à 4°C. L'hybridation avec l'anticorps secondaire chèvre-anti-lapin conjugué à la peroxydase HRP (« Horseradish Peroxidase ») provenant de la chèvre (Jackson, 1:10 000) a été faite dans la solution de blocage sous agitation pendant 1 heure 30 minutes à température ambiante. Chaque étape d'hybridation est suivie de trois lavages de 10 minutes de la membrane avec la solution PBS + 0,1 % (v/v) Tween20.

### **2.3.6 Révélation par chimioluminescence**

Finalement, les protéines ont été détectées par chimioluminescence grâce à la trousse Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, États-Unis). Ce réactif de chimioluminescence est utilisé pour détecter les protéines liées à l'anticorps secondaire couplé à une molécule HRP. L'enzyme HRP catalyse l'émission de lumière à partir de l'oxydation du luminol (ECL). La lumière émise laisse une empreinte sur un film CL-XPosure™ (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) ou est détectée par le Chemi Doc Touch (Biorad, Mississauga, Ontario). La quantification et la détermination de la masse moléculaire a été obtenue à l'aide du logiciel Image Lab (Biorad, Mississauga, Ontario).

### **2.3.7 Isolation de la membrane plasmique des cardiomyocytes et des cellules HEKT**

Toutes les étapes ont été effectuées à 4°C. Quatre différentes fractions (lysat cellulaire total, cytosolique, membrane totale et la membrane plasmique) de protéines ont été préparées selon le protocole publié précédemment (Lizotte et al. 2005). Brièvement, des cellules HEKT transfectées dans des pétris de 100 mm ont été homogénéisées dans une solution de Tris-Base contenant une mixture d'inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich) et 1 mM EDTA à pH 7,4. L'homogénat a été aliquoté en trois tubes. Après 2 heures d'incubation avec 1% (v/v) de Triton X-100, le premier tube a été centrifugé à 10000g pour 10 min afin d'enlever les débris cellulaire, le noyau et les mitochondries. Le surnageant a été récupéré pour obtenir la fraction des protéines totales (Lysat cellulaire totale). Le second tube a été centrifugé à 200000g pour 20 min. Le surnageant obtenu

comprend les protéines cytosolique. Le culot est resuspendu et homogénéisé dans un tampon contenant 1% (v/v) de Triton X-100. Après 30 minutes d'incubation sur glace une seconde centrifugation à 200000g est effectuée. Le surnageant contient les protéines des membranes totales. Le troisième tube est centrifugé à 10000g pour 10 min. Le surnageant obtenu est centrifugé deux fois à 200000g pour 20 min. Le culot est resuspendu dans un tampon contenant 0,6 M KCl. L'échantillon est par la suite centrifugé à 200000g pour 20 minutes afin d'éliminer le KCl. Le culot final est resuspendu dans le tampon d'homogénéisation et contient la fraction protéines à la membrane plasmique. Un immunobuvardage est exécuté avec les différentes fractions.

## **2.4 Cytométrie en flux**

### **2.4.1 Préparation des cellules**

La cytométrie de flux est une technique qui permet de mesurer simultanément plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule. Il est possible de déterminer sa taille relative (FSC pour « Forward Scatter»), sa granularité relative (SSC pour « Side Scatter ») et l'intensité de la fluorescence émise par différents fluorophores (FI pour « Fluorescence Intensity »). L'appareil de cytométrie en flux utilise un laser et les cellules passent une par une devant le faisceau. Selon la lumière réémise (qui détermine à la fois les paramètres FI et SSC) et la lumière transmise (qui détermine le paramètre FSC), les cellules vont pouvoir être triées selon leurs propriétés. Ces caractéristiques ont permis de déterminer les cellules vivantes et extraire des cellules mortes et les débris. Notre but ayant été de quantifier la sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta$  à la membrane, nous avons utilisé les résultats du paramètre FI en FITC et mCherry suite à la transfections des cellules HEK $\beta$ 3 stable avec la construction mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta$ -HA.

Les échantillons ont été divisés en deux catégories soit non perméabilisés et perméabilisés. Les cellules ont été dissociées 24 heures après la transfection avec 400  $\mu$ L de Trypsine-EDTA 0,05% et resuspendues dans 1 mL de milieu DMEM-HG (10% FBS) sans antibiotique. Celles-ci ont été centrifugées à 400 x g pendant 3 minutes puis lavées une fois avec du PBS 1X. Par la suite, les cellules ont été resuspendues dans 600  $\mu$ L de PBS, desquels sont prélevés 100  $\mu$ L pour y ajouter 5  $\mu$ g/mL d'anticorps anti-HA couplé au fluorophore FITC (« Fluoresceine Iso Thio Cyanate ») (Monoclonal anti-HA

FITC produit chez la souris) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Les cellules ont été incubées avec agitation pendant 45 minutes à l'obscurité. Les échantillons ont été ensuite centrifugés 3 min à 400 x g et le surnageant est jeté. Les cellules ont été rincées trois fois avec 1 mL de PBS. Le culot final a été resuspendu dans 500 µL de PBS 1X et transféré dans des tubes spéciaux pour l'analyse au FACS (BD Biosciences, San Jose, CA).

Pour les échantillons perméabilisés, les cellules ont été incubées 20 minutes à 4°C afin de les fixer et de les perméabiliser à l'aide de la solution BD Fixation/Permeabilization (BD Biosciences, San Jose, CA) suite au prélèvement de 100 µL de cellules. La solution de lavage BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences, San Jose, CA) a été ajoutée aux échantillons centrifugés 400 x g pendant 3 minutes et lavés une fois de plus avec la même solution. Les cellules sont par la suite incubées avec l'anticorps anti-HA FITC pendant 30 minutes à 4°C dans la solution de lavage. Celles-ci sont par la suite rincées deux fois comme précédemment à l'aide la solution BD Perm/Wash buffer et transférées dans les tubes après resuspendu dans 500 µL de PBS 1X.

#### **2.4.2 Prise des données**

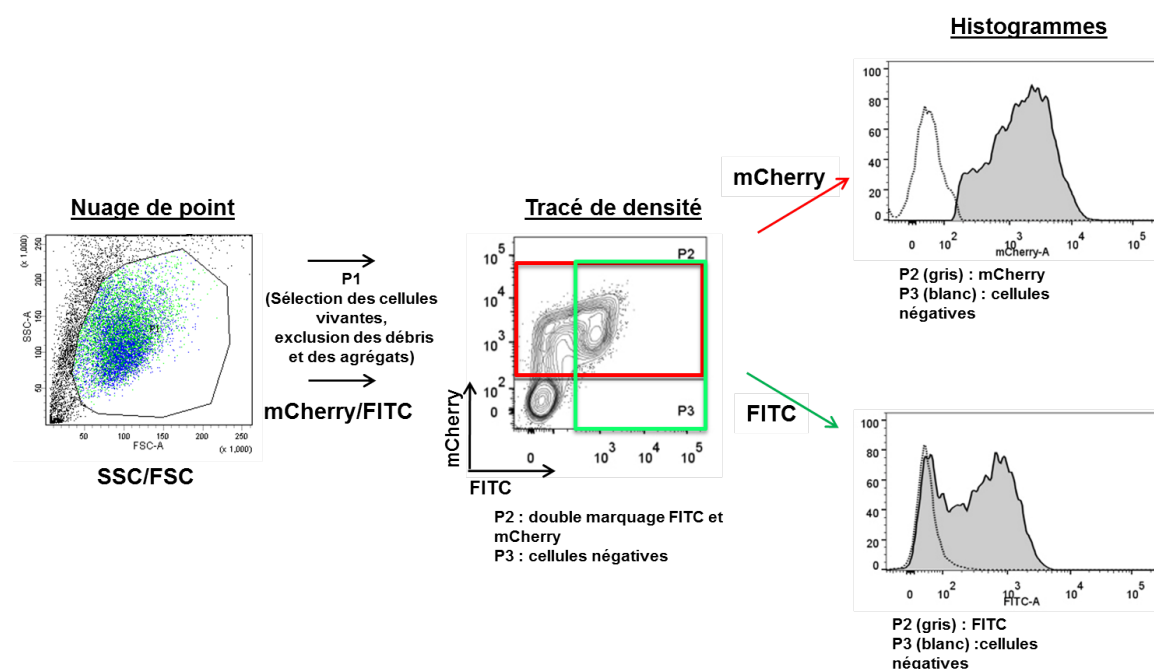
L'appareil de cytométrie en flux le FACS Aria III® du département de microbiologie et d'immunologie de l'Université de Montréal a été utilisé. Les mesures ont été effectuées par monsieur Serge Sénéchal, agent de recherche du laboratoire de cytométrie de flux.

#### **2.4.3 Analyse des données**

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel Origin. Les données de cytométrie représentent les moyennes d'intensité de fluorescence  $\pm$  SEM d'au moins trois séries d'expériences indépendantes.

Les résultats de cytométrie ont été analysés (**Figure 2.2**) et les figures ont été produites en utilisant le logiciel FlowJo version 10 (TreeStar, Ashland, OR). Les cellules mortes ont été exclues selon le profil de FSC/SSC qui a été déterminé manuellement. Les cellules positives en FITC/mCherry (P2) et négative en FITC/mCherry (P3) ont été déterminées manuellement. Un histogramme du nombre de cellules par rapport à l'intensité de fluorescence en FITC est obtenu. Le  $\Delta$ MFI (différence de la moyenne d'intensité de fluorescence) pour le FITC a été calculé en soustrayant la densité de

fluorescence des cellules négative en FITC, (P3) à la densité de fluorescence en FITC des cellules positives (P2). Le  $\Delta$ MFI a été utilisé afin de déterminer la densité à la membrane de protéines possédant l'épitope HA dans les cellules non- perméabilisées intactes ou l'expression totale de la protéine dans les cellules perméabilisées. Puisque le niveau d'autofluorescence dans une cellule est altéré par le changement de milieu de perméabilisation, le  $\Delta$ MFI ne peut être comparé entre les cellules non-perméabilisées et perméabilisées.



**Figure 2.2. Méthodes d'analyse des échantillons en cytométrie en flux.** Il y a sélection des cellules vivantes qui seront transposées dans un graphique de la fluorescence en mCherry par rapport à la fluorescence en FITC. La fluorescence de chacun des fluorophores sera transformée en histogramme du nombre de cellule relative par rapport à l'intensité de fluorescence.

## 2.5 Microscopie confocale

### 2.5.1 Imagerie des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ont été fixées à l'aide de paraformaldéhyde 2% à pH 7,4 pendant 15 min à 4°C. Les cellules ont été par la suite perméabilisées pendant 1 heure à température pièce par une solution contenant 0,1% Triton X-100. Trois lavages avec du PBS ont été effectués après chaque étape. Afin de prévenir la liaison non-spécifique des

anticorps, les cellules ont été incubées dans 2% de sérum d'âne pour 1 heure. Les cellules incubent de 16 à 18 heures avec l'anticorps primaire anti-Ca<sub>v</sub>α2δ (1 :50) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) dans 1% de sérum d'âne et 0,05% Triton. Par la suite, elles ont été incubées dans l'anticorps secondaire Alexa 488 (1 :800) (Life Technologies, Burlington, On, Canada) pour 90 minutes à température pièce. Un marquage de 10 min a été effectué avec le DAPI (1 :1000) (Life Technologies) pour identifier le noyau et avec le Wheat germ agglutinin-647 (WGA647) (1 :200) (Life Technologies) pour visualiser les glycoprotéines de la membrane cellulaire. Le WGA reconnaît sélectivement l'acide sialic et les résidus acétylglucosaminyl. Les images de microscopie confocale ont été obtenues avec un microscope confocale Zeiss LSM 710 avec un objectif 63X/1.40 avec huile. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel FIJI afin d'éliminer le bruit de fond et produire une carte de colocalisation de pixels.

### **2.5.2 Imagerie des HEKT**

Les cellules HEKT qui expriment de façon stable Ca<sub>v</sub>β3 ont été transfectées avec pCMV-Ca<sub>v</sub>1.2 et mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ-HA WT ou les mutants de glycosylation. Les cellules ont été divisées 6 heures après la transfection afin d'obtenir des cellules isolées. Exactement 24 heures suite à la transfection, les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-HA couplé au FITC (1 :100) (Clone HA-7, Sigma ) et le noyau est marqué au DAPI (1 :1000) dans du PBS pour 45 min à 4°C. Les images de microscopie confocale ont été obtenues avec un microscope confocale Zeiss LSM 710 avec un objectif 63X/1.40 avec huile.

## **2.6 Électrophysiologie**

### **2.6.1 Enregistrements des données (par Benoîte Bourdin, Behzad Shakeri, Guillaume Roussel et Émilie Segura)**

Les cellules HEKT ont été resuspendues 24 heures après la transfection, pour être mises en culture à une densité suffisamment faible pour obtenir des cellules isolées au jour deux.

Les expériences de « patch-clamp » ont été faites 48 heures après la transfection, en configuration cellule entière et en utilisant l'amplificateur Axopatch 200-B (Molecular devices, Union City, CA, USA). La résistance des électrodes se situe entre 2 à 4 MΩ et

elles sont remplies avec une solution contenant (en mM) : 140 CsCl; 0,6 NaGTP; 3 MgATP; 10 EGTA; 10 Hepes. Le pH de la solution a été ajusté à 7,4 avec du NaOH. Les enregistrements se font directement dans les boîtes de Petri. Les cellules baignent dans une solution saline de Earle modifiée qui contient (en mM) : 135 NaCl; 20 TEACl; 2 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 10 Hepes. Le pH de la solution a été ajusté à 7,4 avec du KOH. Le logiciel PClamp Clampex 10,2 couplé au système d'acquisition Digidata 1440A (Molecular Devices, Union City, USA) a été utilisé pour l'acquisition et l'analyse de données. La compensation pour la capacitance de la pipette et de la cellule ainsi que la compensation pour la résistance en série ont été appliquées jusqu'à 80% en utilisant la fonction de compensation de l'amplificateur. La capacitance de la cellule a été estimée en mesurant la constante de temps du déclin du courant provoqué par un pulse dépolarisant de 10 mV appliqué sur une cellule à partir un potentiel de repos de -100 mV. Une série de pulses de 450 ms a été appliquée à partir d'un potentiel de repos de -100 mV à une fréquence de 0,2 Hz, de -60 à +70 mV à des intervalles de 5 mV. Les données ont été enregistrées à une fréquence de 5 kHz et filtrées à 1 kHz. Les expériences ont été effectuées à la température ambiante (20 – 22°C).

### 2.6.2 Analyse des données électrophysiologiques

Les paramètres d'activation ont été estimés à partir des courbes des densités de courant (pA/pF) en fonction du voltage (V). Le potentiel de mi-activation  $E_{0,5,act}$  a été estimé à partir du lissage de la courbe pA/pF-V selon l'équation de Boltzmann. L'énergie libre d'activation  $\Delta G_{act}$  a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\Delta G_{act} = z \cdot F \cdot E_{0,5,act}$$

où  $\Delta G_{act}$  : énergie libre d'activation de Gibbs,  $z$  : déplacement de charge,  $F$  : constante de Faraday,  $E_{0,5,act}$  : potentiel de mi-activation.

### 3 RÉSULTATS (par article)

La section des résultats est présentée dans l'article intitulé « *Identification of glycosylation sites essential for the functional modulation of the cardiac L-type calcium channel by the  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  subunit* ». Ce dernier a été soumis dans la revue scientifique *The Journal of Biological Chemistry*.

Marie-Philippe Tétreault a produit les mutations simples et multiples d'asparagine en glutamine, effectué et analysé les expériences de cytométrie en flux, les essais de cycloheximide, les traitements de PNGase et la microscopie confocale sur les HEKT.

Dr. Benoîte Bourdin a effectué les expériences avec les cardiomyocytes de souris, les expériences de patch clamp, isolé les fractions de membranes sarcolemales à partir des cardiomyocytes de souris et les fraction de membrane plasmique des cellules HEKT et effectué les immunobuvardages des Figure 1B et 2A.

Julie Briot (MSc.) a réalisé l'expérience sur la PNGase sur les constructions 6xNQ et 14xNQ de la figure 2C.

Émilie a produit quelques expériences de cytométrie en flux et de patch-clamp.

Dr. Sylvie Lesage a supervisé l'analyse des expériences en cytométrie en flux.

Dr. Céline Fiset a supervisé l'isolation et la culture des cardiomyocytes de souris.

Dr. Lucie Parent a élaboré et supervisé l'étude, interprété les résultats et écrit le manuscrit.

De plus, tous les auteurs ont participé aux révisions des résultats et approuvé la version finale du manuscrit.

Identification of glycosylation sites essential for surface expression of the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  subunit and modulation of the cardiac  $\text{Ca}_v1.2$  channel activity\*

Marie-Philippe Tétreault<sup>§</sup>, Benoîte Bourdin<sup>§</sup>, Julie Briot<sup>§</sup>, Emilie Segura<sup>§</sup>,  
Sylvie Lesage<sup>&</sup>, Céline Fiset<sup>%</sup>, and Lucie Parent<sup>§</sup><sup>1</sup>

<sup>§</sup> Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Faculté de Médecine, Montreal Heart Institute Research Centre; <sup>%</sup> Faculté de Pharmacie, Montreal Heart Institute Research Centre; & Département de Microbiologie, Infectiologie, et Immunologie, Faculté de Médecine, Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal

#These authors have contributed equally to the manuscript

\*Running title: *N-glycosylation of the cardiac L-type channel complex*

**Keywords:** Calcium channels, cell surface density, gating, recombinant expression, cardiomyocytes, electrophysiology, flow cytometry, confocal imaging

---

## ABSTRACT

Alterations in the L-type current density is one aspect of the electrical remodeling observed in patients suffering from cardiac arrhythmias. Changes in channel function could result from variations in the protein biogenesis, stability, post-translational modification, and/or trafficking in any of the regulatory subunits forming cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel complexes.  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is potentially the most heavily N-glycosylated subunit in the cardiac L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channel complex. Herein we show that enzymatic removal of N-glycans produced a 50 kDa shift in the mobility of cardiac and recombinant  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins. This change was also observed upon simultaneous mutation of the 16 Asn sites. Nonetheless, the mutation of only 6/16 sites was sufficient to significantly 1) reduce the steady-

state cell surface fluorescence of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  as characterized by two-color flow cytometry assays and confocal imaging; 2) decrease protein stability estimated from cycloheximide chase assays; and 3) prevent the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -mediated increase in the peak current density and voltage-dependent gating of  $\text{Ca}_v1.2$ . Reversing the N348Q and N812Q mutations in the non-operational sextuple Asn mutant protein partially restored  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  function. Single mutation N663Q and double mutations N348Q/ N468Q, N348Q/ N812Q, N468Q/N812Q decreased protein stability/synthesis and nearly abolished steady-state cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  as well as the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -induced upregulation of L-type currents. These results demonstrate that Asn663, and to a lesser extent Asn348, Asn468, and Asn812 contribute to protein



**stability/synthesis of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  and furthermore that N-glycosylation of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is essential to produce functional L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.**

---

The regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in cardiac cells is critical to the generation of the force necessary for the myocardium to meet the physiological needs of the body (1). In resting cells, intracellular free ionized  $\text{Ca}^{2+}$  is maintained at a low concentration (nanomolar range) by the concerted action of mechanisms that prevent  $\text{Ca}^{2+}$  entry, promote its extrusion (mostly via the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger), and ensure its storage in the sarcoplasmic reticulum (SR) (2).  $\text{Ca}^{2+}$  entry is mediated mainly by the cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel, which is central to the initiation of excitation–contraction coupling via  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR. Regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current has profound physiological significance. Indeed, alterations in density or the activation/inactivation gating of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels have been implicated in a variety of cardiovascular diseases (3,4), including cardiac arrhythmias such as atrial fibrillation (5-8), heart failure (9,10), and ischemic heart disease (10). The molecular mechanisms underlying changes in the activity of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel remain under study in most pathologies.

The L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channel belongs to the molecular family of high-voltage activated (HVA)  $\text{Ca}_v$  channels. HVA  $\text{Ca}_v1.2$  channels are hetero-oligomers composed by the main pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha 1$  subunit non-covalently bound to the cytoplasmic  $\text{Ca}_v\beta$  auxiliary subunit, the EF-hand protein calmodulin (constitutively bound to the C-terminus of  $\text{Ca}_v\alpha 1$ ), and the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  subunit (11-16). The full complement of auxiliary subunits is required to produce HVA  $\text{Ca}_v1.2$  channels with the properties of the native channels.  $\text{Ca}_v\beta$  promotes the cell surface density of  $\text{Ca}_v1.2$  channels through a high-affinity interaction (17) in part by preventing its degradation by the ubiquitin/proteasome system (18). Co-expression

of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  subunit with  $\text{Ca}_v\beta$ -bound  $\text{Ca}_v\alpha 1$  increases peak current density and promotes channel activation at more negative voltages (19-23). Although the molecular mechanism underlying this effect remains to be fully elucidated, the cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  dictates the net  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (22). The  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  subunit, encoded by *CACNA2D1*, is expressed in skeletal (24) and in cardiac muscle (25) where it is the main isoform associated with  $\text{Ca}_v1.2$  (25,26). The  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  proteins undergo complex co- and post-translational modifications. Endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2$  and  $\text{Ca}_v\delta$  are usually thought to be produced as a single protein of that is proteolytically cleaved and then linked through strong disulfide bonds (27,28). Although  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  has been traditionally described as a type I transmembrane protein, it has been recently shown that  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  proteins associate with the plasma membrane through a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) anchor attached to  $\text{Ca}_v\delta$  (29) although the functional relevance of this process remains to be fully established (30).  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  subunits are also heavily glycosylated. It is estimated that N-glycans contribute to as much as  $\approx 30$ -50 kDa to the molecular mass of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (26,27,31,32) making it a unique target for endoplasmic reticulum (ER) glycoprotein quality control (33-36).

Glycosylation is a form of co- and post-translational covalent modification that serves a variety of structural and functional roles in membrane and secreted proteins. The major classes of glycans being produced in eukaryotic cells are: 1) Asn (N)-linked glycans attached to the nitrogen atom of asparagine side-chains; 2) O-linked glycans attached to the hydroxyl oxygen of serine, threonine, tyrosine, hydroxylysine, or hydroxyproline side-chains; 3) C-linked glycans, a rare form of glycosylation, attached to a carbon on a tryptophan side-chain. N-glycosylation, one of the most abundant types of protein glycosylation (37), is initiated by the

cotranslational addition by the oligosaccharyltransferase of glucose<sub>3</sub>-mannose<sub>9</sub>-N-acetyl glucosamine<sub>2</sub> core oligosaccharides to the Asn residue of the lumenally exposed consensus glycosylation site Asn-X-Ser/Thr (NXS/T) where X is any amino acid except proline (Pro), serine (Ser), and threonine (Thr) (38). The transfer of N-glycans to Asn-X-Ser/Thr sites occurs on the luminal side of the ER membrane while the protein moiety is being synthesized on ER-bound ribosomes, hence only domains that are accessible to the ER lumen will receive N-glycans. Membrane glycoproteins remain anchored in the ER membrane with portion(s) either exposed to the ER lumen, embedded in the membrane, or within the cytoplasm. Subsequent trimming of glucose and mannose residues determines whether the polypeptide undergoes additional folding cycles or is targeted for the ER-associated degradation (ERAD) by retrotranslocation and ubiquitin proteasome-dependent proteolysis in the cytosol. This process is critical to protein biosynthesis and abrogation of glycosylation causes embryonic lethality in mice (39).

Defective glycosylation of cardiac ion channels plays a role in multiple cardiac pathologies (40-44). In this current work we have characterized the role of N-glycosylation on cell surface density and the function of the Ca<sub>v</sub>α2δ1 auxiliary subunit using mobility-shift assays, cycloheximide pulse chase analysis, confocal imaging, flow cytometry assays, and patch-clamp recordings of recombinant Ca<sub>v</sub>1.2 currents. Herein we showed that a single mutation at position Asn663 prevented the cell surface presentation and the function of Ca<sub>v</sub>α2δ1 although the protein remains strongly glycosylated. Mutations of other sites proved to alter channel function to a lesser extent. Simultaneous mutation of 6/16 consensus N-glycosylation sites in the extracellular portion of Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein curtailed protein stability and impaired channel function with a predominant role for Asn348 and Asn812. Furthermore,

combining the N468Q mutation with N348Q and/or N812Q disturbed L-type channel function. Mutations of the other Asn sites (out of the 16 tested) were without significant functional impact. Altogether our data support a model where four Asn residues are essential to form functional L-type Ca<sub>v</sub>1.2 currents.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Recombinant DNA techniques.* The rabbit Ca<sub>v</sub>1.2 (GenBank X15539) and the rat Ca<sub>v</sub>β3 (Genbank M88751) (45) were subcloned in commercial vectors under the control of the CMV promoter as described elsewhere (22,46). The primary sequence (1091 residues) of the rat brain Ca<sub>v</sub>α2δ1 clone (Genbank NM\_012919) (47) was subcloned in three vectors. Most experiments were performed with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA where Ca<sub>v</sub>α2δ1 was subcloned in the pmCherry-N1 vector (*Cederlane, Burlington, ON, Canada*) between the *SacI* and *Sall* sites and the hemagglutinin (HA) epitope (YPYDVPDYA) was inserted in the extracellular domain of Ca<sub>v</sub>α2 between D676 and R677 (22). Ca<sub>v</sub>α2δ1 was also subcloned in homemade vectors derived from the pCMV-Script vector and are referred to as pCMV- Ca<sub>v</sub>α2δ1 and pC2- Ca<sub>v</sub>α2δ1 in Fig 2B. Except for Fig 2B, the pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA construct is used throughout.

*Site-directed mutagenesis.* Single pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA mutants were produced with the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (*New England Biolabs Inc., Whitby, ON, Canada*) as described elsewhere (22). Multiple glycosylation mutations were introduced simultaneously in the pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA construct using Gibson Assembly Master Mix (*New England Biolabs*) according to the manufacturer's instructions. Briefly, multiple overlapping primers were designed to incorporate mutations in Ca<sub>v</sub>α2δ1. Fragments containing the mutations were PCR amplified, purified from

agarose gel using Qiaquick Gel Extraction Kit (*Qiagen, Mississauga, ON, Canada*) and assembled with the 2X Gibson Assembly Master Mix before transformation into high-efficiency DH5-a competent *E. coli*. Constructs were verified by automated double-stranded sequence analysis (*Genomics Platform, IRIC, Université de Montréal, QC, Canada*). In this current work, multiple mutations are referred to as “yxNQ” where “y” denotes the number of Asn (N) to Gln (Q) or NQ mutations introduced in the constructs. Accordingly the multiple mutations used in this manuscript include: **4xNQ**: N92Q/N348Q/N594Q/N876Q; **5xNQ**: N92Q/N184Q/N468Q/N876Q/N986Q; **6xNQ**: N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q; **7xNQ**: N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q/N986Q; **13xNQ**: N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/N468Q/N585Q/N594Q/N769Q/N812Q/N876Q/N883Q/N986Q/N1066Q; **14xNQ**: N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/N468Q/N585Q/N594Q/N663Q/N769Q/N812Q/N876Q/N883Q/N986Q/N1066Q; **16xNQ**: N92Q/N136Q/N184Q/N324Q/N348Q/N468Q/N475Q/N585Q/N594Q/N663Q/N769Q/N812Q/N876Q/N883Q/N973Q/N986Q. Protein expression of these constructs was confirmed by western blotting in total cell lysates as previously described (17,22).

*Cell culture and transfections.* HEK293T (HEKT) and HEKT cells stably transfected with Ca<sub>v</sub>b3 were grown in Dulbecco’s high-glucose minimum essential medium (DMEM-HG) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin-streptomycin at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere as described elsewhere (17,22). Cells were transfected at 80-90% confluence (1 million cells per 35-mm culture dish) with similar amounts of DNA (1:1 ratio or 4 µg : 4 µg) for pCMV-Ca<sub>v</sub>1.2 WT and pCMV-based Ca<sub>v</sub>α2δ1 constructs in 10 µL Lipofectamine 2000 (*Life Technologies, Burlington, ON, Canada*) using a DNA:lipid ratio

of 1:2.5 (17,22). The pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA construct was either expressed as pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or as pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA NQ mutants. Mock transfection was achieved with the empty vector referred to as pmCherry-no insert. A total of 8 µg of DNA was thus transfected per 10<sup>6</sup> HEKT stable Ca<sub>v</sub>b3 cells in all experiments.

*Culture and imaging of mouse cardiomyocytes.* Experiments were approved by the Animal Protection Committee of the Montreal Heart Institute (protocol no. 2014-44-01) and were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8<sup>th</sup> Edition (2011). Ventricular myocytes were isolated from neonate (22,48,49) or adult (50) CD-1 mice as described elsewhere. In the latter case, CD-1 male mice (5 month-old) (*Charles River Laboratories, St. Constant, Canada*) were anesthetized with isofurane. Hearts were quickly removed and placed on ice-cold Tyrode solution containing 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl, 0.33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM Hepes, 5.5 mM glucose, and 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4). Ventricles were isolated and homogenized at 4°C in a Tris-based solution containing a mix of protease inhibitors (*Sigma-Aldrich*) including 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin, and 1 mM EDTA at pH 7.4 (50). Cells were fixed (2 % paraformaldehyde, pH 7.4, 15 min, 4°C), blocked and permeabilized (2% normal donkey serum, 0.1% Triton X-100, 60 min, at room temperature). Three washes with phosphate-buffered saline (PBS) followed each step. After overnight incubation at 4°C with primary anti-Ca<sub>v</sub>α2δ1 antibody (1:50) (*Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA*) in 1% donkey serum with 0.05% Triton, cells were incubated with the secondary Alexa 488 antibody (*Life Technologies*) (1:800) for 90 min at room temperature. Cultured cells

were stained with DAPI (1:1000) (*Life Technologies*) for 10 min to identify the nucleus and with the wheat germ agglutinin-647 (WGA-647) (1:200) (*Life Technologies*) to visualize cell membrane glycoproteins (51,52). WGA is a carbohydrate-binding protein of approximately 36 kDa that selectively recognizes sialic acid and N-acetylglucosaminyl sugar residues. Confocal fluorescent images were captured with a Zeiss LSM 710 confocal microscope system with a 63x/1.40 oil objective. The images were analyzed using FIJI software to delete background, subtract noise, and to produce colocalization pixel maps.

*Live imaging of HEKT cells.* HEKT cells stably transfected with  $\text{Ca}_v\beta 3$  were transiently transfected simultaneously with pCMV- $\text{Ca}_v1.2$  and pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or NQ mutants. Cells were dissociated and seeded 6 hours after transfection to obtain isolated cells for imaging. Exactly 24 h after transfection, cells were stained with the Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse monoclonal anti-HA. Nuclei were stained with DAPI (1:1000) (*Life Technologies*) in PBS 1X for 45 min at 4°C. Confocal fluorescent images were captured with the same Zeiss LSM 710 confocal microscope used for cardiomyocyte imaging (see above).

*Glycosidase assays.* Isolated mouse cardiomyocytes or transfected HEKT cells were solubilized in a radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mM Tris, pH 8.0) (*Sigma-Aldrich*) supplemented with a protease inhibitor cocktail (*Sigma-Aldrich*). Cell lysates (20 µg proteins) were first incubated under denaturing conditions (0.5% SDS and 40 mM DTT) and then treated with 500 units peptide N-glycosidase F (*PNGase F*, *New England Biolab*) during 1 h at 37°C according to the manufacturer's instructions.

Proteins were added to the Laemmli sample buffer in the presence of 0.4 mM 2-mercaptoethanol and electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide gel alongside the Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (*Bio-Rad*, *Mississauga, ON, Canada*). After electroblotting and blocking with 5% (w/v) skim milk for 30 min, the supported nitrocellulose membranes (*Bio-Rad*) were incubated with the anti- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  (1:750, *Alomone*, *Jerusalem, Israel*). Membranes were stripped and incubated with an anti-GAPDH as a loading control (1:10000, *Sigma-Aldrich*) unless stated otherwise. Signal was detected with the Biorad ECL Chemiluminescent Substrate. Blots were visualized with the ChemiDoc Touch documentation system (*Bio-Rad*). Molecular weights were estimated using Image Lab™ Software by linear regression of standard molecular weight markers. The molecular mass of the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein in cardiomyocytes was calculated at 123 kDa. The calculated molecular mass of the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA construct is 153 kDa. GAPDH migrated as a monomer close to 37 kDa in accordance with its calculated mass.

*Cycloheximide chase assays.* Stably transfected  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells were transiently transfected simultaneously with pCMV- $\text{Ca}_v1.2$  WT and pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or mutants. Cells were incubated with 100 µg/mL cycloheximide (*Sigma-Aldrich*) to block *de novo* protein synthesis 24 to 36 h after transfection. At the indicated time points (0 h or no cycloheximide, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 10 h, 24 h), cell lysates were fractionated on a 8% SDS-PAGE followed by immunoblotting to visualize  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (*Alomone*, 1:750) and GAPDH (*Sigma*, 1:10000). Protein density  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  in total lysates was estimated with Image Lab 5.2 (*Biorad*). It was expressed relative to GAPDH and normalized to the relative protein density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT measured at time 0. The time course of degradation was measured in 3 to 5 experiments.

Each symbol represents the mean  $\pm$  S.E.M of the normalized protein density.

*Isolation of the plasma membrane fraction from cardiomyocytes and HEKT cells.* Four different protein fractions (total cell lysates, cytosolic, total membrane, and plasma membrane fraction) were prepared according to a protocol published previously (50). Briefly, transfected HEKT cells cultured in 100 mm dishes were homogenized at 4°C in a Tris-based solution containing a mix of protease inhibitors (*Sigma-Aldrich*) and 1 mM EDTA at pH 7.4. The cell homogenate was aliquoted into three tubes. After a 2-h incubation period at 4°C with 1% (v/v) Triton X-100, the first tube was centrifuged at 10000g for 10 min to remove cell debris, nuclei, and mitochondria. The supernatant was kept as the total protein fraction (whole cell lysates). The second tube was centrifuged at 200000g and 4°C for 20 min. The supernatant is referred to as the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in homogenizing buffer containing 1% (v/v) Triton X-100. After 30 min incubation on ice, a second centrifugation was done at 200000g. The resulting supernatant is referred to as the total membrane protein fraction. The third tube was centrifuged at 10000g for 10 min. The supernatant obtained was centrifuged at 200000g and 4°C for 20 min. The pellet was resuspended in the homogenizing buffer containing 0.6M KCl. Subsequent centrifugations were performed at 200000g and 4°C for 20 min to wash out the KCl. The final pellet was resuspended in the homogenizing buffer and is considered to be enriched in plasma membrane proteins. Proteins were electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide gel and blotted with the anti-Ca $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (*Aviva System Biology 1:1000*).

*Flow cytometry assays.* Flow cytometry experiments were conducted as described elsewhere (22). Stably Ca $\alpha$ 3 cells were

transiently transfected simultaneously with pCMV-Ca $\alpha$ 1.2 WT and pmCherry-Ca $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants. To determine cell surface expression level of the mCherry-Ca $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA proteins, cells were harvested 24 h after transfection, washed in a PBS 1X buffer and stained with the FITC-conjugated mouse monoclonal anti-HA epitope tag antibody at 5  $\mu$ g/mL (*Sigma-Aldrich*) at 4°C for 30 min. To determine the total quantity of both intracellular and extracellular expression of the tagged proteins, cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix / Cytoperm™ Fixation / Permeabilization Solution Kit (*Becton Dickinson Biosciences, Mississauga, ON, Canada*) (22). Roughly 10,000 cells were counted using a FACS Aria III® SORP (Special Order research Product) flow cytometer (*Becton Dickinson*) at the Flow cytometry facility hosted by the Department of Microbiologie, Infectiologie, Immunologie at the Université de Montréal. The level of fluorescence detected with the IgG1-FITC Isotype Control Murine (5 mg/mL) or with the anti-HA FITC conjugated antibody (5 mg/mL) in HEKT untransfected cells was not significantly different than the fluorescence measured in the complete absence of fluorophore (22). Control conditions were carried out in triplicate with each series of experiments: a) untransfected Ca $\alpha$ 3 cells without anti-HA FITC conjugated antibody; b) untransfected Ca $\alpha$ 3 cells with the anti-HA FITC conjugated antibody to assess the level of background staining; c) Ca $\alpha$ 3 cells transfected with pmCherry-Ca $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT. Expressing the mCherry-Ca $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT constructs in HEKT cells produced a significant 3-log increase in the FITC fluorescence (“x” axis) and mCherry fluorescence (“y” axis) on the two-dimensional plots (22).

*Quantification of steady-state cell surface expression by flow cytometry assays.* Flow cytometry data were analyzed using the FlowJo software, version 10 (*TreeStar, Ashland, OR*

97520) as described (22). Relative expression of Cav $\alpha$ 2d1 was calculated based on  $\Delta$ Mean Fluorescence Intensity ( $\Delta$ MFI) for each fluorophore (mCherry or FITC) as explained elsewhere (22). Briefly, the positive cells gate (P2) and the negative cells gate (P3), were set manually. The fluorescence intensity within the region delineated by the P2 and P3 gates was displayed as cell count versus fluorescence intensity. The  $\Delta$ MFI for FITC was calculated by subtracting the FITC fluorescence density of the FITC negative cells (P3) from the fluorescence density of the FITC positive cells (P2). The same method was used to calculate the  $\Delta$ MFI for mCherry. Under our experimental conditions, the fluorescence intensity follows a normal distribution hence the mean was equivalent to the median for all intents and purposes.  $\Delta$ MFI for FITC measured in intact non-permeabilized cells was used as a relative index of the steady-state cell surface density of the HA-tagged Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. The  $\Delta$ MFI values for FITC was measured in permeabilized cells to confirm the accessibility of the HA epitope. It is also a valid estimation of the total protein density since the relative  $\Delta$ MFI values for FITC estimated in permeabilized cells are comparable to the relative  $\Delta$ MFI values for mCherry measured under the same conditions. DMFI values were normalized to the maximum value measured the same day for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT expressed under the same conditions to account for variations in the absolute fluorescence intensity of the anti-HA FITC conjugated antibody. The DMFI values for FITC and mCherry obtained over the course of several months were pooled and are reported in **Table 3.1 and Data not shown**) along with the number of triplicate experiments. The normalized DMFI values for mCherry measured for each mutant in intact and permeabilized cells were not significantly different from one another ( $p > 0.05$ ) suggesting that the cell permeabilization procedure did not distort significantly the relative fluorescence readout.

*Patch-clamp experiments in HEKT cells.* Whole-cell patch-clamp experiments were carried out on isolated cells after transfection in HEKT Cav $\beta$ 3 cells in the presence of the peGFP vector (0.2  $\mu$ g) as a control for transfection efficiency. Electrodes were filled with a solution containing (in mM): 140 CsCl; 0.6 NaGTP; 3 MgATP; 10 EGTA; 10 HEPES; titrated to pH 7.3 with NaOH. Cells were bathed in a modified Earle's saline solution (in mM): 135 NaCl; 20 TEACl; 2 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES, titrated to pH 7.3 with KOH. On-line data acquisition was achieved with the Axopatch 200-B amplifier (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*) connected with the PClamp software Clampex 10.5 through the Digidata 1440A acquisition system (*Molecular Devices*) (22). A series of 450 ms-voltage pulses were applied from a holding potential of -100 mV at a frequency of 0.2 Hz, from -60 to +70 mV at 5 mV intervals. Series resistance was compensated to ~85% after online capacitive transient cancellation. Unless stated otherwise, whole-cell currents were sampled at 5 kHz and filtered at 1 kHz. PClamp software Clampfit10.5 was used for data analysis. Mid-potential of activation values ( $E_{0.5,act}$ ) were estimated from the peak I-V curves obtained for each channel composition and were reported as the mean of individual measurements  $\pm$  S.E.M (22,53) (**Table 3.2**). The free energy of activation was calculated using the mid-activation potential:

$$\Delta G_{act} = z \cdot F \cdot E_{0.5,act} \quad (1)$$

where  $z$  is the effective charge displacement during activation, and  $F$  is the Faraday constant (54). The r100 ratio is defined as the ratio of peak whole-cell currents remaining after a depolarizing pulse of 100 ms ( $I_{100ms} / I_{Peak}$ ) and was used as an indicator of the inactivation kinetics. The pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct was previously shown to carry the functional modulation of Cav1.2 currents (22). Each novel pmCherry-

Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA mutant was tested alongside the control WT construct (*pCMV-Ca<sub>v</sub>1.2 WT + pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT with Ca<sub>v</sub>β3 cells*) to assess for internal consistency thus explaining the large sample size for the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT construct. Experiments performed under the same conditions yielded peak current densities that could vary by as much as ± 35% between each series of experiments. This variation appeared to be essentially linked to minor changes in the cell density at the time of transfection. Data from all experiments performed under the same conditions over a period of 16 months were pooled and biophysical properties are reported in Table 3.2. Experiments were performed at room temperature (18-20°C).

*Statistics.* Results were expressed as mean ± S.E.M. Tests of significance were carried out using the unpaired ANOVA with the Tukey Test embedded in the Origin 7.0 analysis software (*OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*). Data were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

*Cardiac Ca<sub>v</sub>α2δ1 proteins are glycosylated.* Ca<sub>v</sub>α2δ1 is largely believed to be the most heavily glycosylated protein within the cardiac L-type channel complex (32). Triple-color immunostaining of cultured mouse cardiomyocytes with wheat germ agglutinin (WGA), a plasma membrane marker that binds glycoproteins with high affinity, DAPI, a marker for the nucleus, and an anti- Ca<sub>v</sub>α2δ1 demonstrated that the glycoprotein Ca<sub>v</sub>α2δ1 colocalized with WGA (**Fig 3.1A**). The expression of the endogenous Ca<sub>v</sub>α2δ1 in the sarcolemmal membrane-enriched fraction in mouse cardiomyocytes was confirmed by membrane fractionation followed by SDS-PAGE. As seen, the major protein species migrated at an

apparent molecular mass of 160 kDa in all fractions (**Fig 3.1B**), which is similar to the mobility of the Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein expressed in brain (29). Given that the calculated molecular mass of the rodent Ca<sub>v</sub>α2δ1 is 124 kDa, this suggests the native protein undergoes significant co- or post-translational modifications. To note, partially glycosylated species were not detected under our experimental conditions. Enzymatic deglycosylation carried out with PNGase F, an amidase that removes all saccharide moieties, reduced the electrophoretic mobility of the endogenous protein from 160 to 110 kDa (**Fig 3.1C**). The 50-kDa decrease in the mobility of endogenous Ca<sub>v</sub>α2δ1 is compatible with the addition of N-glycans onto 10 to 14 N-glycosylation sites (26,27,31).

*Molecular identification of N-glycosylation sites in Ca<sub>v</sub>α2δ1.* By definition, N-linked glycans are attached to the nitrogen atom of an asparagine side-chain within the Asn-X-Ser/Thr consensus sequence where X is not a proline residue. It is estimated that at least two thirds of those sites are likely to be N-glycosylated (55). Using this strict definition, we identified 16 putative glycosylation sites in the extracellular portion of the Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein: N92, N136, N184, N324, N348, N468, N475, N585, N594, N663, N769, N812, N876, N883, N973, and N986 in the rat isoform (**Fig 3.2A** and **Data not shown**). Six sites are conserved in the primary sequence of the human, rat, and mouse Ca<sub>v</sub>α2δ1: N92, N184, N348, N468, N594, and N812. The N348 and N468 sites are also conserved in Ca<sub>v</sub>α2δ2. Many Asn-X-Ser sites are glycosylated inefficiently in vitro (56) whereas Asn-X-Thr sites are usually efficiently glycosylated. Even though the presence of the Asn-X-Ser/Thr site is necessary for the receipt of an N-glycan, transfer of the N-glycan to this site does not always occur, due to conformational or other constraints during glycoprotein folding (55). Enzymatic digestion with PNGase F carried out with whole-cell lysates from recombinant

Ca<sub>v</sub>α2δ1 expressed in HEKT cells, demonstrated also a reduction of 50 kDa in the electrophoretic mobility of Ca<sub>v</sub>α2δ1 (**Fig 3.2B**), similar to the one observed above for the endogenous Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein. The mobility-shift assay also suggests that the Ca<sub>v</sub>δ protein may not be proteolytically cleaved under our experimental conditions (57,58). The molecular determinants responsible for N-type glycosylation were investigated using a mutational analysis. Multiple Asn to Gln mutants were produced in the pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA construct that was previously shown to be expressed at the plasma membrane and fully functional (22). The glycosylation status of multiple constructs 6xNQ (N92Q/ N184Q/ N348Q/ N594Q/ N812Q/ N876Q) that includes the 6 Asn sites that were predicted to be the most likely to be glycosylated and the 14xNQ construct (N92Q/ N136Q/ N184Q/ N348Q/ N468Q/ N585Q/ N594Q/ N663Q/ N769Q/ N812Q/ N876Q/ N883Q/ N986Q/ N1066Q) that includes the 14 Asn sites with a likelihood above 0.5 (59) were first investigated. Western blots produced with whole-cell lysates showed that pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT migrated as a doublet with a faint band at ≈ 200 kDa and a stronger band ≈ 175 kDa (**Fig 3.2C**). The 6xNQ and the 14xNQ proteins produced a band pattern of significantly weaker intensity with protein mobility reduced by ≈ 25 and ≈ 45 kDa respectively (**Fig 3.2C**) suggesting that acquisition of N-glycans was not completely impaired in the 6xNQ and the 14xNQ mutants. Indeed, enzymatic digestion with PNGase F further reduced the electrophoretic mobility and produced similar migration profiles for the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT, 6xNQ and the 14xNQ proteins. Altogether, this observation supports the view that some of the Asn residues mutated in the 6xNQ construct (N92, N184, N348, N594, N812, and/or N876), some of the additional residues substituted in the 14xNQ construct (N136, N468, N585, N663, N769, N883, N986, and /or N1066), and possibly the two remaining residues (N475 and N973), are

acquiring N-glycans either co-translationally or post-translationally.

*Disrupting six Asn sites impaired steady-state surface density of Ca<sub>v</sub>α2δ1.* To evaluate whether the partially glycosylated forms reach the plasma membrane, we quantified the cell surface fluorescence of the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT and NQ constructs in two-color flow cytometry assays. In this construct, the mCherry fluorescence is constitutive but the fluorescence of the FITC-conjugated HA antibody was shown to be proportional to the fraction of proteins present at the cell surface since the HA epitope is located in the extracellular portion of Ca<sub>v</sub>α2δ1 (22). In particular, the fluorescence intensity DMFI for FITC measured in intact cells provides a reliable index of the steady-state cell surface density of Ca<sub>v</sub>α2δ1 and is observed as a rightward shift in the fluorescence intensity on the “x” axis of the two-dimensional plots. The mCherry epitope expressed at the C-terminal of the construct, served as a marker for total protein expression (observed as a shift in the fluorescence intensity seen on the “y” axis of the two-dimensional plots). The two-color assay thus provided a quick and reliable readout of protein expression. Control experiments carried out with the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1WT control construct that was not HA-tagged, confirmed the specificity of the FITC antibody in these series of experiments (**Fig 3.3A**). The fluorescence histograms for the corresponding experiment were reported to the right of the contour plots while the averaged mean fluorescence intensity values (DMFI) obtained from ≥ 3 distinct experiments are shown on **Fig 3.3C**. As seen, the fluorescence intensity DMFI for FITC in intact nonpermeabilized cells was strong for the WT and the 4xNQ construct, but sharply decreased from the 5xNQ to the 13xNQ constructs (**Data not shown**). These constructs produced proteins that were almost absent from the cell surface. Nonetheless a slightly different version of the 6xNQ mutant (N92Q/ N184Q/



N468Q/ N594Q/ N876Q/ N986Q) was present at the cell surface at a density similar to the 4xNQ mutant (**Data not shown**). Assays were also conducted after cell permeabilization and the fluorescence histograms shown alongside confirmed the accessibility of the HA epitope. Altogether, these results suggest that 1) Mutations of consensus N-glycosylation sites is associated with decreased steady-state cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ ; 2) Mutations of consensus N-glycosylation sites impaired total protein density; 3) N-glycosylation sites may not be all functionally equivalent.

*Disrupting Asn sites impairs channel function.* Mutating the consensus N-linked glycosylation reduced the steady-state cell surface density of the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein. Its impact on the L-type  $\text{Ca}_v 1.2$  channel function was explored after recombinant expression of  $\text{Ca}_v 1.2$  with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA multiple NQ mutants in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells. As reported before (22), co-expression of pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT with  $\text{Ca}_v 1.2$  WT in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells stimulated whole-cell peak current densities from  $-3 \pm 1$  pA/pF ( $n = 29$ ) (no insert in the pmCherry vector) to  $-30 \pm 1$  pA/pF ( $n = 234$ ) in the presence of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  WT (**Fig 3.3B, 3.3D**). The increase in peak current densities was associated with a  $\approx -15$  mV leftward shift in the activation potential of  $\text{Ca}_v 1.2$  from  $E_{0.5, \text{act}} = 8 \pm 2$  mV ( $n = 35$ ) (no  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ ) to  $E_{0.5, \text{act}} = -9.6 \pm 0.1$  mV ( $n = 231$ ) (with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA). As seen, coexpression with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA mutants containing 4 (4xNQ), 6 (6xNQ), and 13 (13xNQ) Asn to Gln mutations yielded voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents. Mutating 4 sites did not appreciably alter whole-cell peak current density but mutations of 2 additional consensus sites in the 6xNQ mutant (N92Q/ N184Q/ N348Q/ N594Q/ N812Q/ N876Q) was sufficient to significantly decrease by 6-fold the peak current density of  $\text{Ca}_v 1.2$  currents. Furthermore, peak current densities measured with the 13xNQ mutant were not statistically different than  $\text{Ca}^{2+}$

currents obtained in the absence of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . These results suggest that residues N184 and N812 could be among the most critical residues in carrying channel modulation.

*Only a few Asn residues contribute to  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  function.* Cell surface density, protein stability, and channel function was significantly impaired in the 6xNQ construct. To identify the individual contribution of each residue to the functional response, reverse Gln to Asn mutations (QN mutations) were introduced in the 6xNQ construct. As seen, reinstating the N812 site, with the “6xNQ + Q812N” mutant, nearly restored the steady-state cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  and L-type channel function (**Fig 3.4A-B**). Reintroducing N348, with the “6xNQ + Q348N” mutant, was also seen to significantly improve cell surface density and channel function. These data suggest that N348Q could account for the large decrease in the cell surface density of the 4xNQ mutant. In both cases, the increase in the relative cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (**Fig 3.4C**) was correlated with an augmentation of the peak current density as compared with the 6xNQ mutant (**Fig 3.4D**). In addition, the mean DMFI for FITC in permeabilized cells (an index of total cell density) increased in these two reverse mutants suggesting that protein stability and/or synthesis was also improved as compared with the 6xNQ mutant (**Fig 3.4C**). The individual impact of each Asn site was finally investigated in single point mutations. Sixteen (16) single Asn to Gln (NQ) mutations were tested (N92Q; N136Q; N184Q; N324Q; N348Q; N468Q; N475Q; N585Q; N594Q; N663Q; N769Q; N812Q; N812A; N876Q; N883Q; N973Q; and N986Q) (**Fig 3.5, Table 3.1**). Most single mutations only caused small changes in the relative fluorescence intensity at the cell surface without significant change in channel gating, suggesting that these single mutants reached the cell surface in their native conformation. One can suppose that small changes in the surface fluorescence could result

from minor alterations in the protein trafficking or protein conformation. Nine mutations (N136Q, N324Q, N475Q, N585Q, N594Q, N769Q, N876Q, N883Q, and N986Q) produced fluorescent patterns for FITC and mCherry not significantly different ( $p > 0.05$ ) than the wild-type construct suggesting that neither surface density nor protein stability was affected by these single mutations. Three single mutations mCherry-Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA N92Q, mCherry-Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA N184Q, and mCherry-Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA N973Q produced proteins that yielded slightly smaller fluorescent signals (by  $\approx 15$ -20%) than the control mCherry-Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT construct ( $p < 0.05$ ). However, all these above-mentioned single NQ mutants stimulated peak currents to the same extent as the wild-type construct ( $p > 0.05$ ) (**Table 3.2**).

Four (4) single point mutations (N348Q, N468Q, N663Q, and N812Q) significant decreased the fluorescence at the cell surface ( $p < 0.001$ ). The strongest impact produced by a single mutation was obtained with N663Q that eradicated cell surface fluorescence and channel function (**Fig 3.5, Tables 3.1-2**). In addition, N812Q and N812A produced proteins that significantly decreased cell-surface fluorescence. Data from the flow cytometry assays were corroborated with confocal images captured with live cells stained with the FITC conjugated anti-HA tag antibody. Cell surface fluorescence intensity decreased sharply for the 6xNQ mutant and was noticeably weaker for the single N812Q mutant than for the wild-type construct (**Fig 3.6**). In agreement with the fluorescence data, N812Q generated currents that were twice larger than the 6xNQ mutant but  $\approx 3$ -times smaller than currents produced with the wild-type construct ( $p < 0.01$ ) (**Table 3.2**).

The potentially additive effect of these residues (save for N663Q that was already non-functional on its own) was investigated in double mutants. Pairing Asn sites in different combinations, to form double mutants N348Q/ N468Q, N348Q/ N812Q, and N468Q/ N812Q, produced proteins

that significantly reduced the steady-state cell surface density of Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1 and modulation of Ca $v$ 1.2 currents (**Fig 3.7, Tables 3.1-3.2; and Data not shown**). Pairing N92Q, with either N348Q, N468Q, or N812Q as one of the partners, yielded voltage-activated currents that were roughly 50% lower than produced with the wild-type construct. In contrast, other mCherry-Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA double NQ mutants (N92/N184Q, N92Q/N594Q, N136Q/N184Q, N136Q/N769Q, and N594Q/ N876Q) produced whole-cell currents similar to the mCherry-Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT construct ( $p > 0.05$ ). The series of wild-type-like double mutants include N136Q/N184Q previously shown to prevent the subunit-mediated regulation of Ca $v$ 2.2 currents (60). These results suggest that N348, N468, N663, and N812 in Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1 play unique roles in the function of Ca $v$ 1.2.

Mutations of these sites produced Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins with impaired N-glycosylation. Mobility shift-assays were carried out before and after digestion with PNGase F in three separate series of experiments: with double mutants N136Q/N184Q, N348Q/N468Q, N348Q/N812Q and N468Q/N812Q (**Fig 3.8A**), multiple mutants that were not detected at the membrane N348Q/N468Q/N812Q and N92Q/ N184Q/ N348Q/ N468Q/ N594Q/ N812Q (**Fig 3.8B**), and single N663Q (**Fig 3.8C**). Under control conditions, there was a small but significant decrease in the protein mobility ( $< 10$  kDa) for the double mutants when compared with the WT construct and a smaller one with single mutations although this was not always clearly evident. Digestion with PNGase F decreased the electrophoretic mobility of N663Q, as well as the double, triple and sextuple mutants, respectively by 48, 45, 40, and 30 kDa respectively. These results confirm that the simultaneous mutation of these Asn sites significantly affected the glycosylation status of Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1 although the Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein remains strongly N-linked glycosylated. Together, these data show that the Ca $v\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein is heavily glycosylated on many,

if not all of the 16 Asn sites since the simultaneous mutation of the 16 sites eliminated the formation of the glycosylated protein (**Fig 3.8D**).

*Protein stability/synthesis was impaired in Asn mutants.* The decrease in the cell surface density of the double mutants N348Q/N812Q and N468Q/N812Q was accompanied by a 50-60% decrease in the FITC fluorescence under permeabilized conditions suggesting that protein stability was severely altered. Chase assays were carried out in the presence of cycloheximide (a blocker of *de novo* protein synthesis) to document the time course of protein degradation. Cycloheximide was added 24 h after transfection and total cell lysates were collected at different time points. Protein density was estimated from western blots relative to the loading control GAPDH and normalized using the protein density of the WT construct at time 0 (**Fig 3.9A-B-C**). In all cases, major band formed by the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT construct disappeared with a half-life estimated at  $2.8 \pm 0.5$  h ( $n = 7$ ) (**Fig 3.9D**). As compared with the WT construct, the relative protein density of the double mutants N348Q/N812Q and N468Q/N812Q were significantly lower even at time 0 despite the increased protein loading in the gel. The degradation kinetics were also slightly faster with  $t_{1/2} \approx 1.2 \pm 0.8$  h ( $n = 2$ ) and  $t_{1/2} = 1.8 \pm 0.5$  h ( $n = 3$ ) respectively. These data suggest that N-glycosylation at these sites is required for protein translation or else that kinetics of degradation of NQ mutants are faster than the kinetics of protein synthesis, an observation that was also reported for glycosylation-defective mutations of the type 1 transmembrane auxiliary subunit KCNE1 (43).

## DISCUSSION

*16 Asn sites account for N-type glycosylation of Ca<sub>v</sub>α2δ1.* N-linked glycosylation is one of the most common post-translational modifications known to influence the turnover and the stability of cardiac ion channels (61-65). With the cardiac Ca<sub>v</sub>1.2 macromolecular complex, Ca<sub>v</sub>α2δ1 is the most heavily glycosylated protein (13) with N-glycans increasing the apparent molecular mass by about 50 kDa. The fully glycosylated form was found to be the dominant protein species of the endogenous Ca<sub>v</sub>α2δ1 found in the plasma and associated caveolea membranes of isolated cardiomyocytes. In this current work we have addressed the role of N-glycosylation in the protein density, steady-state cell surface levels, and the function of the Ca<sub>v</sub>α2δ1 auxiliary subunit using mobility-shift assays, cycloheximide pulse chase analysis, flow cytometry assays, and patch-clamp recordings of recombinant Ca<sub>v</sub>1.2 currents. The 16 consensus N-type glycosylation sites were characterized after single or multiple mutations of Asn to Gln. By combining fluorescence and functional assays, we demonstrated that multiple glycosylation-defective mutants reduced the steady-state cell surface density, decreased total protein density, and diminished protein stability of Ca<sub>v</sub>α2δ1. The drop in the cell surface expression of Ca<sub>v</sub>α2δ1 in turn significantly impaired peak current density and activation gating of the L-type Ca<sub>v</sub>1.2 channel.

Enzymatic digestion with PNGase F of the native and recombinant Ca<sub>v</sub>α2δ1 reduced by 50 kDa the electrophoretic mobility of the protein. A similar mobility shift was observed when comparing the migration profile of the WT and the 16xNQ construct demonstrating that many if not all the 16 Asn sites are required to account for the N-glycosylated state of the Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein. Interestingly, the recently published 3D structure of the skeletal muscle Ca<sub>v</sub>1.1 channel complex is compatible with the proposition that most 16 N-glycan sites are glycosylated (66). The nature of the carbohydrate chain modifications that the

protein undergoes from the endoplasmic reticulum to the post-Golgi compartments was not investigated in this work. We used throughout PNGase F, an amidase that cleaves between the innermost N-Acetylglucosamine and Asn residues of high mannose, hybrid, and complex oligosaccharides from N-linked glycoproteins, thus stripping all glycans from the protein. Protein biogenesis includes trimming of glucose and mannose residues by glycosidases and addition of new residues via glycosyltransferases in the ER and, to a great extent, in the Golgi. In the Golgi, high-mannose N-glycans can be converted to a variety of complex and hybrid forms that are unique to each protein (67). The  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein contains multiple glycosylation sites that may be modified with any of the three classes of N-linked glycans. Adding to the complexity, different units of the same  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  glycoprotein may have different glycan structures attached to the identical Asn site. From the mobility-shift assays conducted with the multiple mutants, it can be argued that many of these 16 sequons are modified by N-glycans even NXS sequons with negatively-charged or hydrophobic amino acids at the X-position (such as N136 and N184) that are considered to be poorer substrates for the oligosaccharyltransferase complex (43,56). The N-glycan modification of many sequons appears to individually contribute 3-5 kDa to  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . Although this is often difficult to detect visually for single mutations, it can be seen more clearly with double mutants. Mobility-shift assays in the presence of PNGase F also confirmed that the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein was produced with the expected molecular mass despite extensive mutations of its N-linked glycosylation sites.

*Mutation of Asn663 prevents cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .* The single mutation of Asn663 (N663Q) prevented the detection of the protein at the cell surface by immunofluorescence and channel modulation. Asn663 is located close to the 9-residue HA epitope that was inserted after

Asp676 in the primary structure of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . Substitution of the asparagine for the glutamine residue did not however prevent protein synthesis as the protein was expressed with the expected molecular mass. Furthermore, the mCherry and the HA epitope of this construction were fluorescently-labelled and detected in intact and permeabilized cells respectively. Every other single Asn mutations within the 16 sites, did not affect cell surface density or protein function thus making Asn663 one of the most critical single site for protein function. Asn sites in the 6xNQ mutant prevented protein detection at the surface and impaired modulation of  $\text{Ca}_v 1.2$  currents. Double mutations pairing N348Q, N812Q and/or N468Q were sufficient to prevent the detection of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  at the cell surface and abolished the subunit-mediated stimulation of  $\text{Ca}_v 1.2$  currents. Other double Asn mutations, including the N136Q/N184Q mutant (60), did not affect cell surface density or protein function. One reason for this discrepancy may lie in the differences in the mode of regulation of  $\text{Ca}_v 1.2$  and  $\text{Ca}_v 2.2$  channels by  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . To limit the number of double mutants to be tested (120 possible double mutants for 16 sequons), our strategy was to produce and characterize multiple mutants that impacted on channel function. Multiple mutants produced with either N348Q, N468Q, or N812Q showed a significant decrease in cell surface density and protein function whereas every single mutation pairing N663Q was not functional. It is impossible to know at this time whether N-glycans at these sites interact with each other or with the pore-forming subunit. Current algorithms and the recent 3D structure of the skeletal  $\text{Ca}_v 1.1$  channel complex (66) are identifying important structural domains but are not predicting the spatial orientation of the 16 N-glycans with each other and other proteins in the channel.

*Protein stability was decreased in glycosylation-defective mutants of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .* The molecular and cellular pathways responsible for the

compromised steady-state cell surface expression of the glycosylation-defective  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins remain to be fully elucidated. The decreased surface levels could result from impaired translational rate (68,69), ER folding yield, trans-Golgi cargo sorting, increased degradation and/or a combination of these processes. The relative contribution of lectin chaperones, such as calnexin and calreticulin, to protein biogenesis, and the nature of the key enzymes responsible for degradation within the ubiquitin-proteasome system of ERAD (68,70-72) also remain to be identified. Outstanding issues include the identification of the quality control networks that are affected by these specific glycosylation sites (73,74) and the potential crosstalk between ERAD and autophagy, the two major cellular degradative pathways (75). Finally there is always the question of overexpressing cardiac proteins in a model cell to study translation events. These are important questions that currently go beyond the scope of this current work. Protein assays herein reported nonetheless support the view that protein stability and/or protein synthesis was impaired in Asn mutants suggesting that N-glycosylation is a co-translational event (43). The observation that partially glycosylated forms of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  were notably absent from whole-cell homogenates prepared with recombinant cells as well as isolated cardiomyocytes further argues for this scenario.

*L-type channel modulation by  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .* Upregulation of L-type currents requires robust cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  in cardiomyocytes (19) and in HEKT cells (22). Alterations in the cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  caused by mutating glycosylation sites (our study), arrhythmogenic mutations (22), mutations within the “von Willebrand factor” structural domain (76,77), or following pharmacological modulation (e.g. gabapentin) (76,78,79) were shown to decrease channel function by altering the surface levels of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (76,77). With the exception of

the so-called R-domain (80), these manipulations altered the function of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (and by extension the function of voltage-gated currents) were doing so through a decrease in the membrane expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . By analogy with other type 1 transmembrane regulatory subunits of voltage-gated ion channels,  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  could interact with the pore-forming subunit either within the membrane through the voltage sensing domain (as KCNE with Kv7 /KCNQ1 channel (81)) and/or from the external portion of the protein by interacting with the external pore domain (77). The optimal ratio for channel modulation remains to be established. By comparison, a single high-affinity intracellular binding site for  $\text{Ca}_v\beta$  onto the I-II linker of the  $\text{Ca}_v\alpha 1$  subunit from high-voltage-activated  $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$  channels has long been identified (17,46,82-84). Whether a single  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  subunit could interact with two  $\text{Ca}_v\alpha 1$  or whether the L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channel complex (85) can accommodate two or more  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  subunits remains a question for debate. Nonetheless, mutations affecting the expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is likely to influence  $\text{Ca}^{2+}$  balance in cardiomyocytes (86-88) as in arterial smooth muscle cells (4) by virtue of controlling the activity of L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels (22).

Beyond their role in protein biogenesis and/or stability (37), N-linked glycans promote interactions with cell adhesion proteins and signaling molecules (40,89) as it is widely understood for members of the integrin family (90).

Recent technical advances in glycoprotein crystallography suggest that the more mobile N-glycans on cell surface receptors could guide the partner ligand to its binding site and prevent irregular protein aggregation by covering oligomerization sites away from the ligand-binding site (91). Glycans could also contribute to channel modulation by altering the surface potential sensed by the gating machinery (92) and/or by modifying conformational changes regulating cooperative subunit interactions during

channel activation (93). The Asn812 site is a choice candidate for such a mechanism. The N812Q mutant was expressed at the cell surface to the same extent as 4xNQ mutant yet it caused a more extensive decrease in channel function. It can be speculated that N-glycans at the Asn812 site contribute to the functional interaction with the pore-forming subunit of the  $\text{Ca}_v1.2$  channel, either through direct protein-protein interaction and/or by promoting a favorable gating conformation (31). Most structural models predict that the extracellular domain is quite disordered making it impossible to predict the relative orientation and/or interaction of each N-glycan chain within the  $\text{Ca}_v1.2$  channel complex. High-affinity interaction between  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  and the pore-forming subunit of  $\text{Ca}_v1.2$  has yet to be demonstrated. The nature of the protein-protein interaction (either direct or through a secondary partner), the sites responsible for this interaction and well as the affinity of the interaction will await further structural characterization of the cardiac  $\text{Ca}_v1.2$  channels. At this time, 3D structures of the purified cardiac  $\text{Ca}_v1.2$  channel complex position the extracellular portion of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  on top of the channel complex at a resolution that prevents identifying interaction domains (32) whereas the recent 3D structure of the skeletal muscle  $\text{Ca}_v1.1$  channel complex suggests that the VWA domain in  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  may be directly interacting with the voltage-sensing region of the pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit (66). Nonetheless, it is becoming quite evident that biological networks exploit cell-surface glycans to coordinate membrane protein complexes (94). Defects in the glycosylation of type I transmembrane auxiliary subunit  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  could hence trigger ventricular and atrial arrhythmias (22,95) by decreasing the fraction of functional L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels. Hence, elucidating the cellular processes controlled by glycosylation contributes to further our understanding of most biological systems and in particular, voltage-gated cardiac ion channels.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Serge Sénéchal and Dr. Jacques Thibodeau for sharing their expertise and granting us access to their flow cytometry and cell sorting platform; Mr. Behzad Shakeri and Dr. Guillaume Roussel for contribution to patch-clamp recordings; Mr. Louis Villeneuve for invaluable assistance in confocal microscopy; Ms Nathalie Ethier for help in isolating adult mouse hearts; Ms Julie Verner for superb training in cell culture methods; and Dr. Rémy Sauvé for critical reading of the manuscript. This work was completed with the operating grant 130256 from the Canadian Institutes of Health Research and a grant-in-aid from the Canadian Heart and Stroke Foundation to L.P.

## CONFLICT OF INTEREST

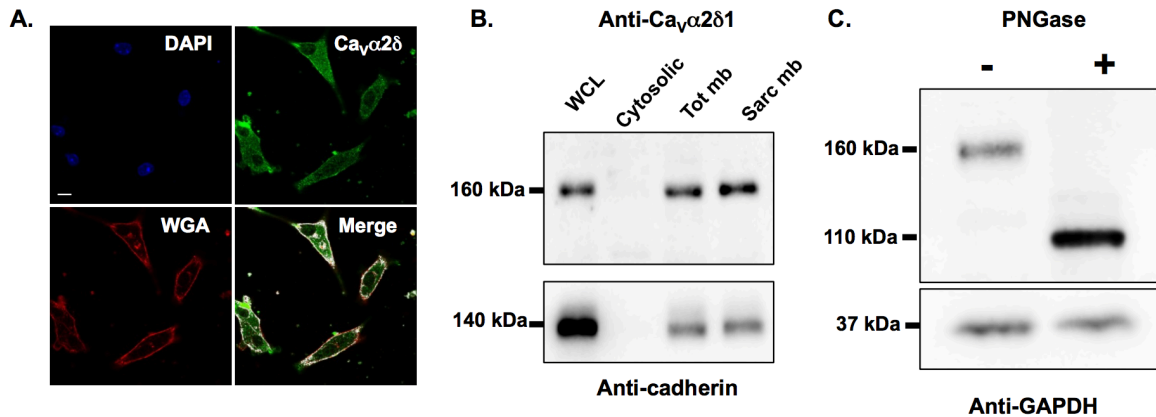
The authors declare that they do not have any conflict of interest with the contents of this manuscript.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MPT produced the single and multiple Asn mutants, performed and analyzed the vast majority of the flow-cytometry experiments, carried out the cycloheximide chase assays, and stained the HEKT cells for confocal microscopy. BB isolated the mouse cardiomyocytes, conducted patch-clamp experiments, isolated the sarcolemmal membrane fractions from mouse cardiomyocytes and the plasma membrane fraction from recombinant HEKT cells as well as carried out the western blots in Fig 1B and Fig 2A. JB produced some constructs and performed the experiments shown in Fig 2C. ES conducted flow-cytometry and patch-clamp experiments for a few mutants. SL supervised the analysis of the flow-cytometry experiments. CF supervised the isolation and the culture of the mouse cardiomyocytes. LP designed and coordinated the study, interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of this manuscript.

## FOOTNOTES

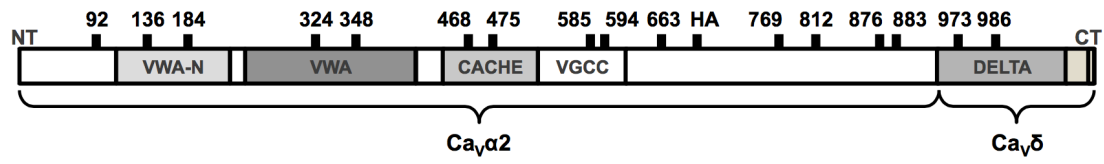
1. The Abbreviations used are : DGact : Free energy of activation; FITC : Fluorescein Isothiocyanate; HA : Hemagglutinin; HEKT : Human Embryonic Kidney 293 cells stably expressing an SV40 temperature-sensitive T antigen; HVA : High-Voltage Activated; DMFI : Relative Mean Fluorescent Intensity; WT : Wild-Type; PNGase F: Peptide -N-Glycosidase F.



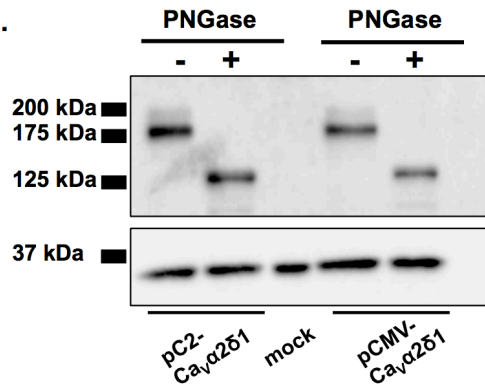
**FIGURE 3.1: A. Endogenous Ca<sub>v</sub>α2δ1 proteins in mouse cardiomyocytes are glycoproteins.** Endogenous Ca<sub>v</sub>α2δ1 in 24h-cultured mouse cardiomyocytes colocalized with wheat germ agglutinin 647 (WGA 647), a plasma membrane marker that displays a high-affinity for glycoproteins. Ca<sub>v</sub>α2δ1 proteins were stained with the anti- Ca<sub>v</sub>α2δ1 as the primary antibody and Alexa488-coupled secondary antibody. Scale bar corresponds to 10 μm. The red channel was arbitrarily assigned to WGA and the green channel was assigned to Ca<sub>v</sub>α2δ1. Nuclei are stained with DAPI (blue). Colocalization pixel maps of Ca<sub>v</sub>α2δ1 and WGA are shown in white and were produced using the co-localization finder plugin in FIJI. **B. Endogenous Ca<sub>v</sub>α2δ1 proteins in the sarcolemmal membrane fraction of mouse cardiomyocytes migrate at 160 kDa.** Four different protein fractions: total (WCL), cytosolic (Cyto), total membrane (Tot mb), and sarcolemmal membrane (Sarc mb) were isolated from ventricles of adult CD-1 mice (50). Proteins were electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide denaturing gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with an anti- Ca<sub>v</sub>α2δ1 (*Aviva System Biology*). The membrane was probed, after stripping, with anti-pan-cadherin (*Invitrogen 1:5000*) as a quality control for the fractionation process. It is worth noting that the 160 kDa protein is dominant species in whole-cell lysates. Each lane was loaded with 10 μg proteins. **C. PNGase F mediated deglycosylation of the N-linked sugars in endogenous Ca<sub>v</sub>α2δ1 proteins from mouse cardiomyocytes.** Total whole cell proteins isolated from ventricles of adult CD-1 mice were denatured 20 min at 60°C before incubation in the absence (–) or presence (+) of peptide N-glycosidase F (PNGase F) during 1 h at 37°C. Each lane was loaded with 20 μg proteins. Proteins were electrophoresed on an 8% SDS-polyacrylamide denaturing gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with an anti-Ca<sub>v</sub>α2δ1 (*Alomone*) (top panel) and anti-GAPDH (bottom panel) as a loading control.



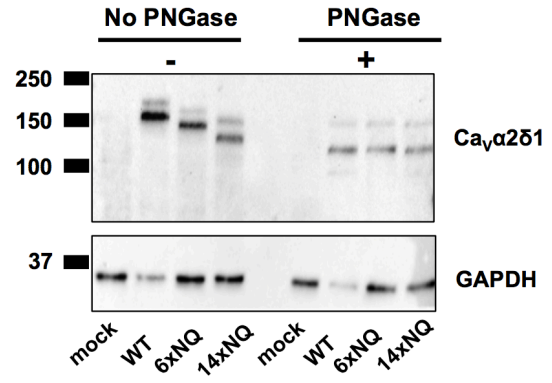
A.



B.



C.

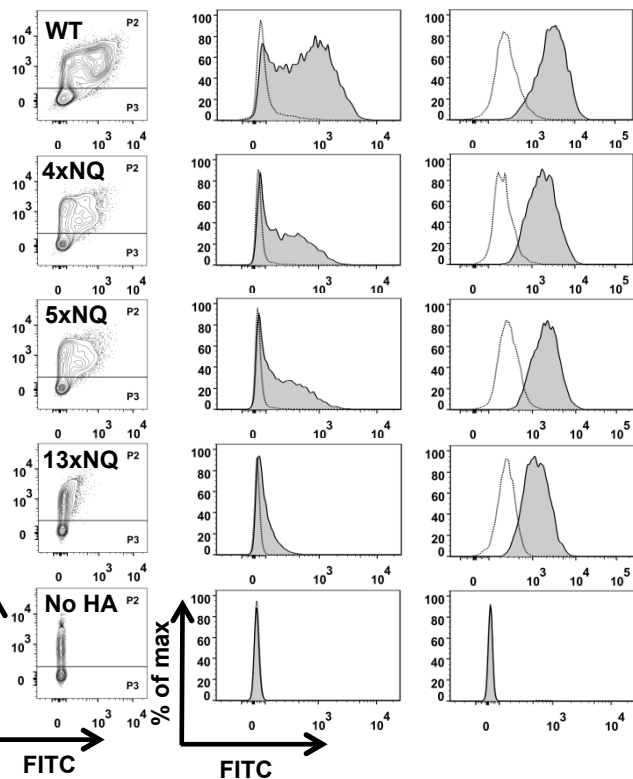


**FIGURE 3.2: PNGase F mediated deglycosylation of the N-linked sugars from Ca<sub>v</sub>α2δ1 expressed in HEKT.** **A.** The relative positions of the predicted N-glycosylation sites are shown on the structural domains of the rat Ca<sub>v</sub>α2δ1. Structural domains were identified using protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) with the UniProtKB/Swiss-Prot database. The four structural domains are shown by boxes: VWAN (NCBI pfam08399), VWA (NCBI smart00327), CACHE (NCBI pfam02743), and VGCC (NCBI pfam08473). **B.** Cells were transiently transfected with pCMV-Ca<sub>v</sub>α2δ1 or pC2-Ca<sub>v</sub>α2δ1. Total cell lysates were extracted 24h after transfection using the protocol described earlier. Total cell lysates were denatured 10 min at 95°C before incubation in the absence (–) or presence (+) of peptide N-glycosidase F (PNGase) during 1 h at 37°C. Proteins were electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide denaturing gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with an anti-Ca<sub>v</sub>α2δ1 (*Alomone*) and anti-GAPDH as a loading control. Each lane was loaded with 10 µg proteins. As seen, the electrophoretic mobility of the Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein decreased by 50 kDa following enzymatic digestion. **C. Mutations of multiple glycosylation sites decreased protein mobility.** HEKT cells were transiently transfected with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT, 6xNQ, or 14xNQ. Exactly 24 h after transfection, cells were lysed and protein lysates were either treated with the vehicle buffer or with PNGase F during 1 hour at 37°C. Proteins were fractionated by SDS-PAGE (8%). Western blot analysis was carried out with the Ca<sub>v</sub>α2δ1 antibody (*Alomone*) as the primary antibody and signal was detected using the Biorad ECL substrate. GAPDH was detected using GAPDH antibody as described above. Lanes 2 (± PNGase) were loaded with 5 µg proteins and lanes 1; 3-4 were loaded with 10 µg. Lane 1: mock-transfected HEKT cells; Lane 2: pmCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT; Lane 3: pmCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA 6xNQ; Lane 4: pmCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA 14xNQ. The calculated molecular masses for the high density band are before treatment with PNGase, Lane 2: 171 kDa; Lane 3: 155 kDa; Lane 4: 133 kDa and after digestion with PNGase, Lane 2: 123 kDa; Lane 3: 123 kDa; and Lane 4: 123 kDa. The 10 kDa -difference in the molecular masses between the 14xNQ before and after treatment with PNGase could suggest that N-glycosylation was not completely eliminated in the 14xNQ mutant or else that the enzymatic treatment itself altered the migration of the protein in the gel.

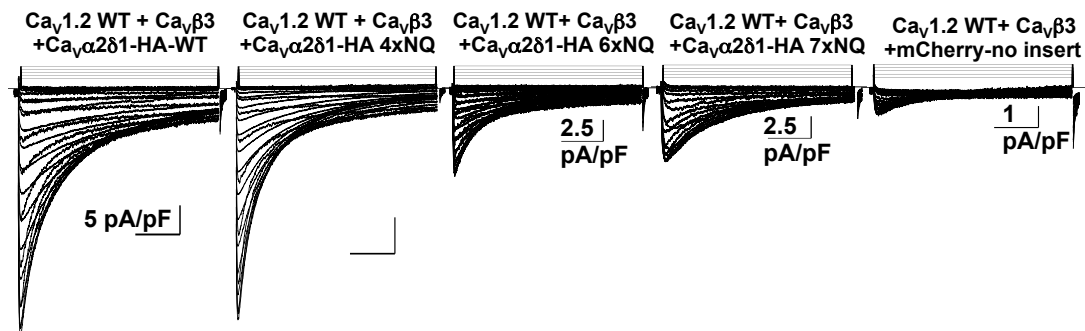
**A.**

*Intact NonPermeabilized (NP)*

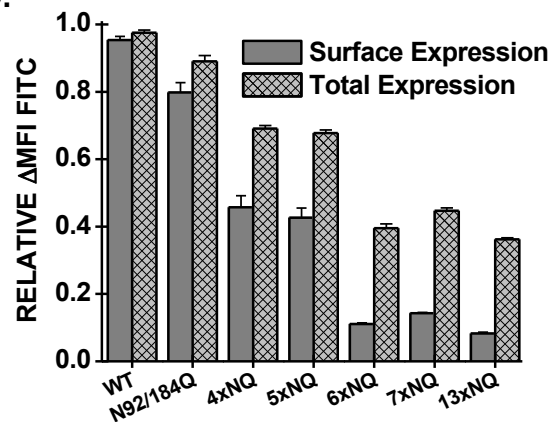
*Permeabilized (P)*



**B.**

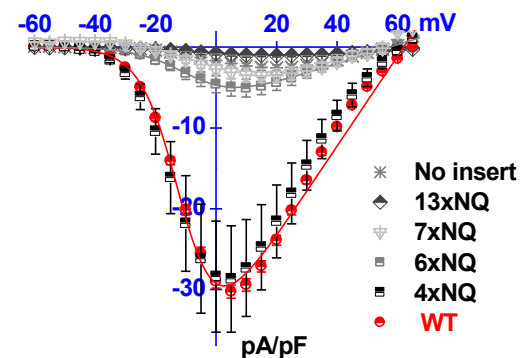


**C.**



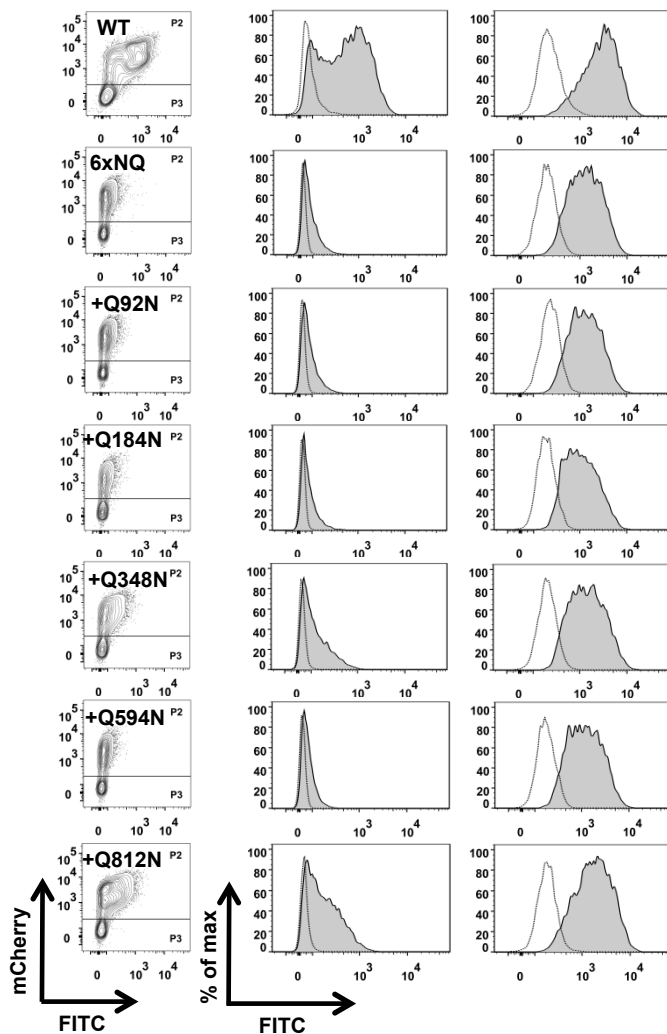
**D.**

$\text{Ca}_v1.2$  + mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA  
WT and NQ mutants in stable  $\text{Ca}_v\beta3$  cells



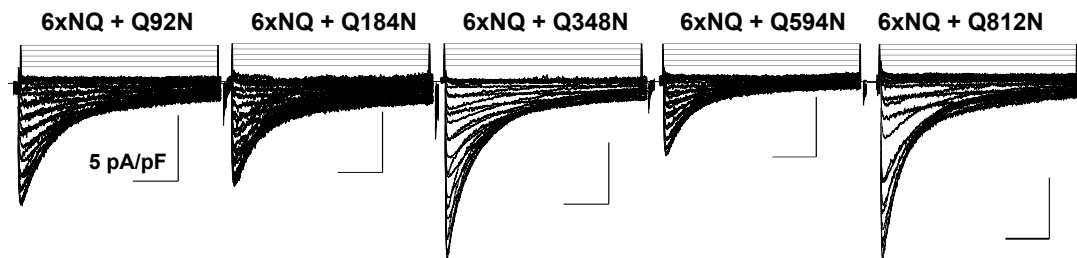
**FIGURE 3.3: Simultaneous mutations of 6 N-glycosylation sites disrupt cell surface expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  and prevent the stimulation of  $\text{Ca}_v 1.2$  currents.** Stably  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells were transiently transfected simultaneously with pCMV- $\text{Ca}_v 1.2$  WT and pmCherry-  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or mutants. **A. Representative two-dimensional plots** of mCherry versus FITC fluorescence are shown for each N-glycosylation mutants (NQ) after the disruption of 4 sites (4xNQ), 5 sites (5xNQ), and 13 sites (13xNQ). The “No HA” construct is mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  WT. The distribution of the fluorescence intensity measured for cells within the P2 gate (fluorescence positive cells) are shown in gray whereas the distribution of fluorescence intensity for cells present in the P3 gate (fluorescence negative cells) is displayed as an overlay in a transparent gray plot. In all cases, the DMFI fluorescence measured for FITC in permeabilized cells was qualitatively similar to the constitutive fluorescence measured for mCherry validating the accessibility of the HA epitope and confirming the values obtained for total protein expression. Numerical values are shown in Table 1 and **Data not shown**. **B. Representative whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  current traces** obtained after recombinant expression of  $\text{Ca}_v 1.2$  in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA glycosylation NQ mutants. The same mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA constructs were used for the flow cytometry assays and the patch-clamp experiments. Currents were recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  from a holding potential of -100 mV. Time scale is 100 ms throughout. Unless specified otherwise, the current density scale is 5 pA/pF. Co-expression with  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  shifted the voltage-dependence of activation of  $\text{Ca}_v 1.2$  WT /  $\text{Ca}_v\beta 3$  from  $E_{0.5, \text{act}} = 8 \pm 2$  mV ( $n = 34$ ) (no  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ ) to  $E_{0.5, \text{act}} = -9.4 \pm 0.2$  mV ( $n = 231$ ) (for  $\text{Ca}_v 1.2$  WT/  $\text{Ca}_v\beta 3$  with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT), a significant -15 mV shift in the activation potential. The free energy of activation (DGact) measured in the presence of mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT was well described by a Gaussian distribution centered at  $-0.86 \pm 0.2$  kcal mol<sup>-1</sup> ( $n = 231$ ). **C. Bar graph shows the normalized DMFI** measured in the presence of FITC in intact (surface expression) or permeabilized cells (total expression) in flow cytometry experiments. **D. Averaged current-voltage relationships.** Typical current traces, recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , are shown for mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT, and the multiple mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA mutants 4xNQ (N92Q/ N348Q /N594Q/ N876Q), 6xNQ (N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/ N812Q/N876Q), 7xNQ (N92Q/ N184Q/ N348Q/ N594Q/ N812Q/ N876Q/ N986Q), 13xNQ (N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/N468Q/ N585Q/N594Q/N769Q/N812Q/N876Q/ N883Q/N986Q/ N1066Q). Currents traces obtained with the mCherry vector are also shown. See Tables 1-2 for analysis of the statistical significance.

**A.** *Intact NonPermeabilized (NP)* *Permeabilized (P)*

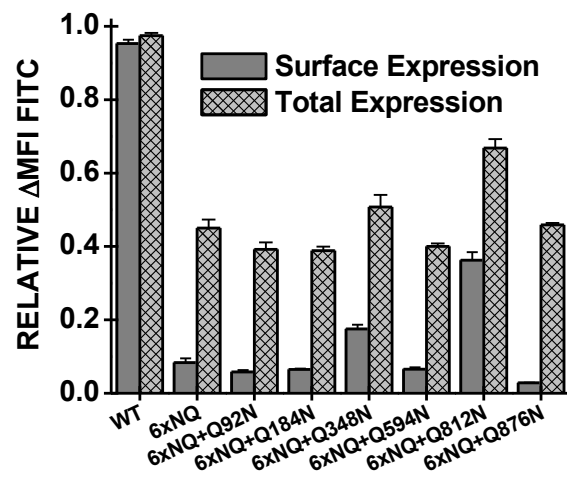


**B.**

**mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA mutations**

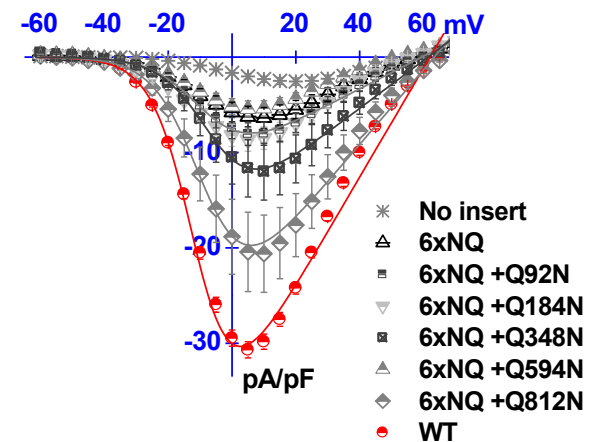


**C.**

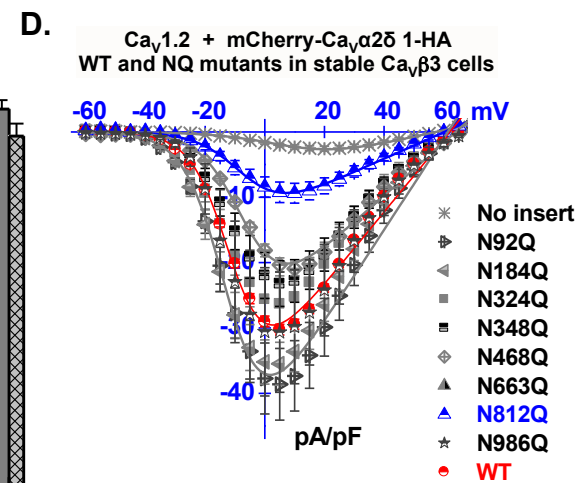
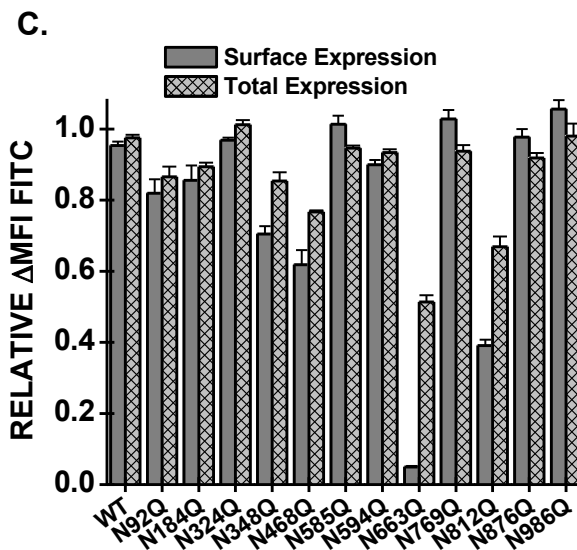
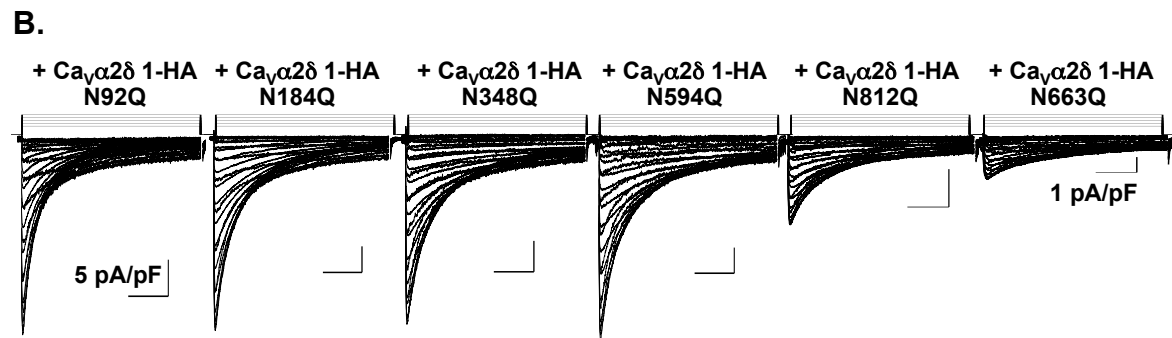
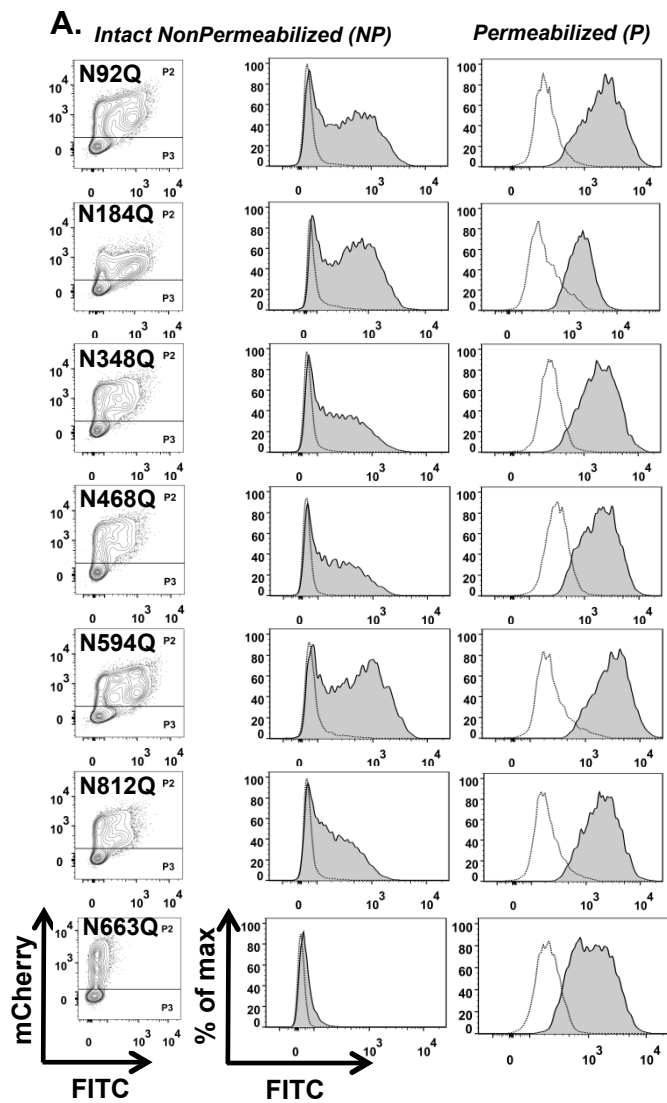


**D.**

**Ca<sub>v</sub>1.2 + mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ 1-HA  
WT and NQ mutants in stable Ca<sub>v</sub>β3 cells**

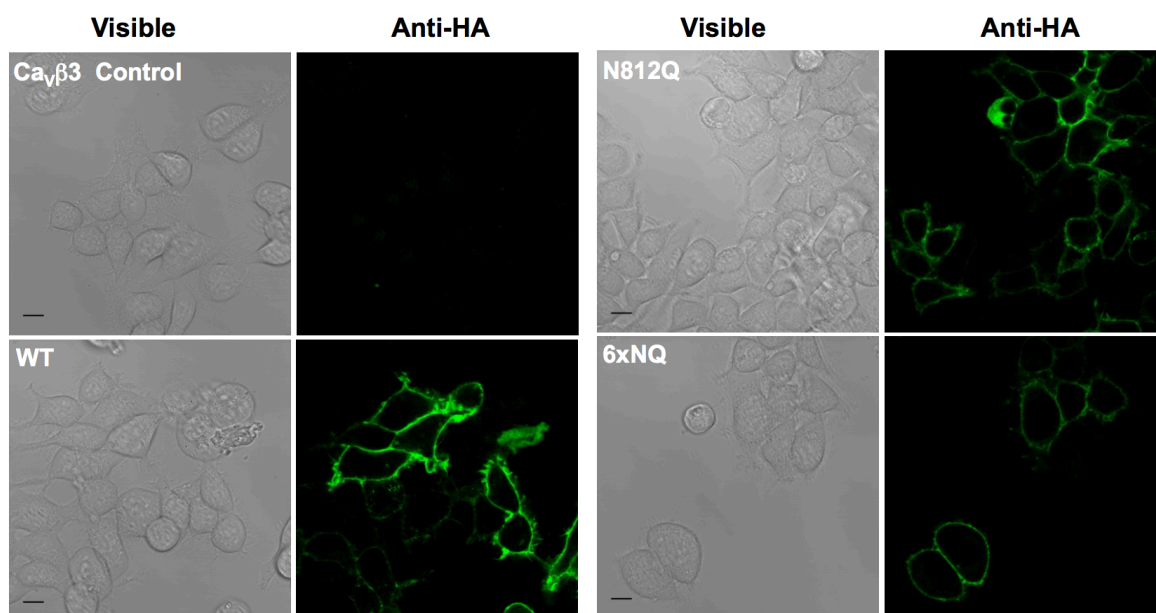


**FIGURE 3.4: Reverse mutation Q812N cancels the impact of the 6xNQ mutant on Ca<sub>v</sub>α2δ1.** **A. Representative two-dimensional plots** of mCherry *versus* FITC fluorescence are shown for each N-glycosylation mutants (NQ). The 6xNQ construct (N92Q/ N184Q/ N348Q/ N594Q/ N812Q/ N876Q) was used as a template from which single point reverse mutations were introduced as indicated. As seen only the reverse mutations Q348N and Q812N effectively expressed at the cell surface. **B. Representative whole-cell Ca<sup>2+</sup> current traces** obtained after recombinant expression of Ca<sub>v</sub>1.2 in stable Ca<sub>v</sub>β3 cells with mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N-glycosylation mutants (NQ). **C. Bar graph** shows the normalized ΔMFI measured in the presence of FITC in intact (surface expression) or permeabilized cells (total expression) in flow cytometry experiments. **D. Averaged current–voltage relationships.** Typical current traces, recorded in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup>, are shown for the reverse mutations mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA 6xNQ + Q92N (N184Q/ N348Q/ N594Q/ N812Q/ N876Q); 6xNQ + Q184N (N92Q/ N348Q/ N594Q/ N812Q/ N876Q); 6xNQ + Q348N (N92Q/ N184Q/ N594Q/ N812Q/ N876Q); 6xNQ+ 594N (N92Q/ N184Q/ N348Q/ N812Q/ N876Q); and 6xNQ + Q812N (N92Q/ N184Q/ N348Q/ N594Q/ N876Q). As a control for relative expression, functional modulation by mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT was always measured under the same conditions (not shown). See Tables 1- 2 for statistical significance.



**FIGURE 3.5: Single mutations N663Q and N812Q decreases cell surface expression of Ca<sub>v</sub>α2δ1 and modulation of Ca<sub>v</sub>1.2 whole-cell currents.** **A. Representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence** are shown for each mutation as stated. **B. Representative whole-cell Ca<sup>2+</sup> current traces** recorded after recombinant expression of Ca<sub>v</sub>1.2 in stable Ca<sub>v</sub>β3 cells with mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or some N-glycosylation single mutants. Unless specified otherwise, the current density scale is 5 pA/pF. Functional modulation by mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT was measured under the same experimental conditions (not shown). **C. Bar graph shows the normalized ΔMFI** measured in the presence of FITC in intact (surface expression) or permeabilized cells (total expression). **D. Current–voltage relationships.** Typical current traces, recorded in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup>, are shown for the single mutations mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N92Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N184Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N324Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N348Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N594Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N663Q mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N812Q, and mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N986Q. Statistical significance is reported Tables 1- 2.

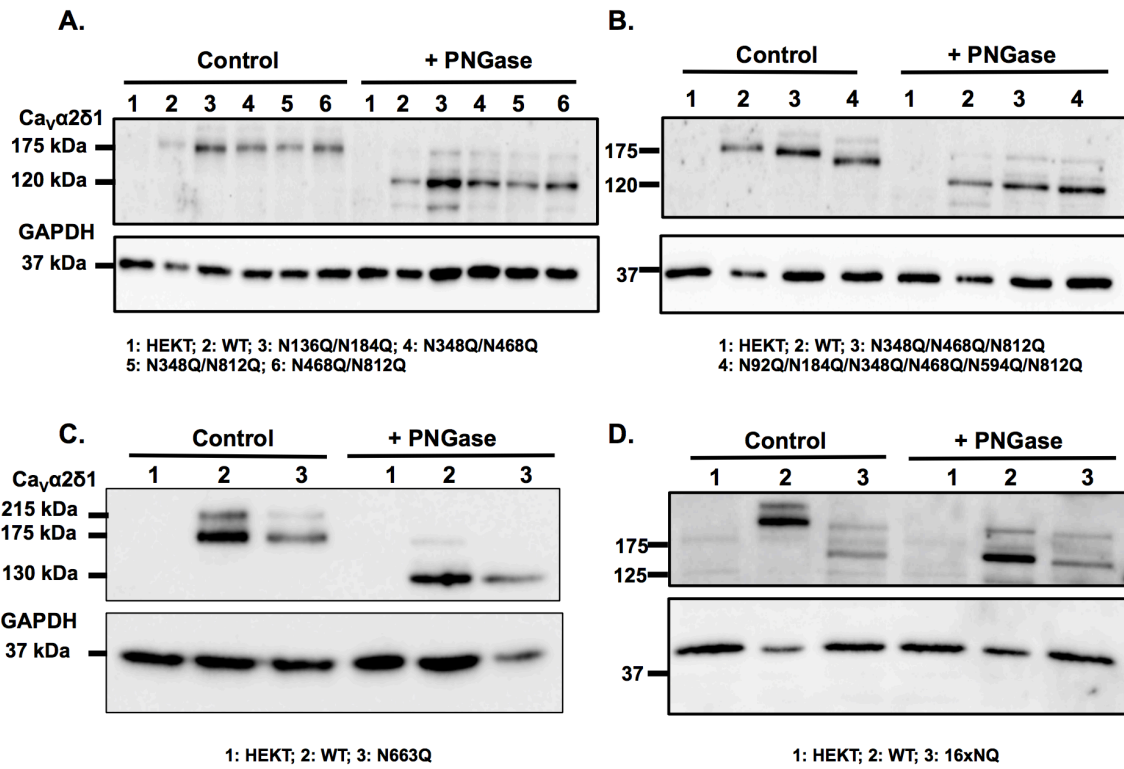




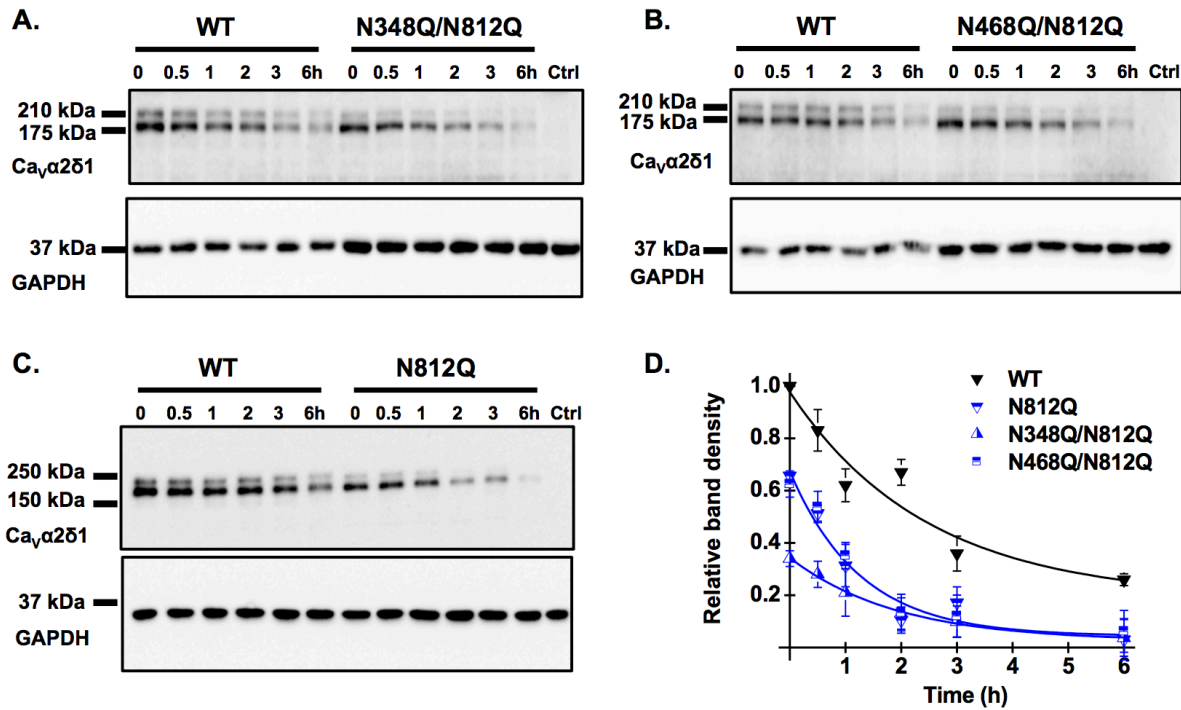
**FIGURE 3.6: Live cell imaging of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins WT and mutants.**  $\text{Ca}_v\beta 3$  stable HEKT cells were transfected with pCMV- $\text{Ca}_v 1.2$  and pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT, N812Q, or 6xNQ (N92Q/ N184Q/ N348Q/ N594Q/ N812Q/ N876Q). One day after transfection, live cells were incubated with the FITC-conjugated anti-HA antibody (1:100) and the nuclei were stained with DAPI (1:1000) (not shown) in PBS 1X for 45 min at 4°C. Confocal fluorescent images were captured with a Zeiss LSM 710 confocal microscope system with 63x/1.40 oil objective. Scale bar corresponds to 10  $\mu\text{m}$ . The immunofluorescent signals from the FITC-conjugated anti-HA antibody (green) are shown to the right of the corresponding differential interference contrast images. Under these conditions, the FITC signal was mostly restricted to the cell surface of intact cells. No signal was observed in nontransfected cells (upper left quadrant) or in the absence of primary or conjugated antibody (not shown).



**FIGURE 3.7: Combining mutations N346Q, N468Q and N812Q eliminate cell surface expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  and modulation of  $\text{Ca}_v1.2$  whole-cell currents.** **A.** Representative two-dimensional plots of mCherry *versus* FITC fluorescence are shown for each mutation as stated. **B.** Representative whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  current traces recorded after recombinant expression of  $\text{Ca}_v1.2$  in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or some double N-glycosylation mutants. Unless specified otherwise, the current density scale is 5 pA/pF. Functional modulation by mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT was measured under the same experimental conditions (not shown). **C.** Bar graph shows the normalized  $\Delta\text{MFI}$  measured in the presence of FITC in intact (surface expression) or permeabilized cells (total expression). In all cases, the DMFI fluorescence measured for FITC in permeabilized cells was qualitatively similar to the constitutive fluorescence measured for mCherry validating the accessibility of the HA epitope and confirming the values obtained for total protein expression. **D.** **Current-voltage relationships.** Typical current traces, recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , are shown for the double mutations mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q/N184Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q/N348Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q/N468Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q/N812Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N348Q/N812Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N468Q/N812Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N348Q/N468Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N594Q/N876Q, and mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N136Q/N184Q. See Tables 1-2 for details.



**FIGURE 3.8: Mutation of all 16 Asn sites appears to remove all N-glycosylation from Ca<sub>v</sub>α2δ1.** HEKT cells were transiently transfected with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT and constructs as described. One day after transfection, cells were lysed and protein lysates were either treated with the vehicle buffer (control condition) or with PNGase F during 1 hour at 37°C. Proteins were fractionated by SDS-PAGE (8%). Western blot analysis was carried out with the Ca<sub>v</sub>α2δ1 antibody (*Alomone*) as the primary antibody. GAPDH was detected using GAPDH antibody. **A.** Lane 1: mock-transfected HEKT cells; Lane 2: mCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT; Lane 3: N136Q/N184Q; Lane 4: N348Q/N468Q; Lane 5: N348Q/N812Q; and Lane 6: N468Q/N812Q. Before treatment with PNGase F, the calculated molecular masses for the high density band were: Lane 2: 173 kDa; Lane 3: 163 kDa; Lane 4: 163 kDa; Lane 5: 166 kDa; and Lane 6: 163 kDa. After digestion with PNGase F: Lane 2: 123 kDa; Lane 3: 121 kDa; Lane 4: 121 kDa; Lane 5: 119 kDa; and Lane 6: 118 kDa. Lanes 2 (± PNGase) were loaded with 5 µg proteins and lanes 1; 3-6 (± PNGase) were loaded with 10 µg. **B.** Lane 1: mock-transfected HEKT cells; Lane 2: mCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT; Lane 3: mCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N348Q/N468Q/N812Q; and Lane 4: mCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N92Q/N184Q/N348Q/N468Q/N594Q/N812Q. Before PNGase F treatment, the calculated molecular masses for the high density band were: Lane 2: 173 kDa; Lane 3: 159 kDa; and Lane 4: 144 kDa. After digestion with PNGase: Lane 2: 123 kDa; Lane 3: 118 kDa; and Lane 4: 116 kDa. Lanes 2 (± PNGase) were loaded with 5 µg proteins and lanes 1; 3-4 (± PNGase) were loaded with 10 µg. **C.** Lane 1: mock-transfected HEKT cells; Lane 2: pmCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT; and Lane 3: N663Q. Before PNGase F treatment, the calculated molecular masses for the high density band were: Lane 2: 173 kDa and Lane 3: 168 kDa. After digestion with PNGase F, the calculated molecular masses for the high density band were: Lane 2: 130 kDa and Lane 3: 130 kDa. All lanes were loaded with 10 µg proteins. **D.** Lane 1: mock-transfected HEKT cells; Lane 2: pmCherry Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT; and Lane 3: 16xNQ. Before PNGase F treatment, the calculated molecular masses for the high density band were: Lane 2: 183 kDa and Lane 3: 132 kDa. After digestion with PNGase F, the calculated molecular masses for the high density band were: Lane 2: 130 kDa and Lane 3: 127 kDa. Lanes 2 (± PNGase) were loaded with 10 µg proteins and lanes 1 and 3 were loaded with 20 µg. There was a 50 kDa reduction in the mobility of the recombinant Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein after the simultaneous mutation of the 16 Asn sites. Furthermore, enzymatic deglycosylation with PNGase F produced recombinant Ca<sub>v</sub>α2δ1 proteins with the same apparent mobility suggesting that the 16 Asn sites account for the full N-glycosylated state of the protein.



**FIGURE 3.9: Mutiple Asn mutations may impair protein stability.** HEKT cells were transiently transfected with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT and the glycosylation mutants N348Q/N812Q (**A**); N468Q/N812Q (**B**); and N812Q (**C**). Exactly 24 h after transfection, subconfluent cells were incubated with 100 μg/mL cycloheximide. At the indicated time points, cell lysates were prepared and fractionated by SDS-PAGE (8%). Ca<sub>v</sub>α2δ1 and GAPDH proteins were respectively probed with the anti-Ca<sub>v</sub>α2δ1 (*Alomone*) and the anti-GAPDH. Please note that we loaded 2x more proteins in the wells for the double mutants to visualize their time course alongside the WT construct. In particular, each lane for Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT was loaded with 5 μg proteins in panels A and B whereas 10 μg proteins were loaded for N348Q/N812Q and N468Q/N812Q. In panel C, 10 μg proteins were loaded for Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT and N812Q. **D. Protein density** was estimated relative to the density of the GAPDH band and normalized to the protein density for the wild-type construct at time 0. Protein band intensities were quantified by densitometry using Image Lab (BioRad) software at a single exposure selected for clear bands without saturation. Averaged data points were fitted with a mono-exponential decay function. The half-life was  $t_{1/2} = 2.8 \pm 0.5$  h ( $n = 7$ ) for pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT;  $t_{1/2} = 1.2 \pm 0.8$  h ( $n = 2$ ) for N348Q/N812Q;  $t_{1/2} = 1.8 \pm 0.5$  h ( $n = 3$ ) for N468Q/N812Q; and  $t_{1/2} = 1.9 \pm 0.7$  h ( $n = 3$ ) for N812Q. As seen, the data points for the decay of N812Q and N468Q/N812Q are superimposed with similar relative densities whereas protein density for N348Q/N812Q was lower at time 0.

**TABLE 3.1. RELATIVE FLUORESCENCE INTENSITY DMFI FOR CHERRY-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT and mutants**

| mCherry- Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA mutant<br>with Ca <sub>v</sub> 1.2 WT in<br>Ca <sub>v</sub> b3 stable HEKT cells | DMFI FITC   |   | DMFI mCherry                                    |   |
|---|---|---|---|---|
|   | Intact cells<br><i>(Relative surface density)</i> | Perm cells<br><i>(Relative total density)</i> | Intact cells<br><i>(Relative total density)</i> | Perm cells<br><i>(Relative total density)</i> |
| + mCherry-Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA WT  | 0.96 ± 0.02 (66)                                  | 0.97 ± 0.01 (66)                              | 0.97 ± 0.01 (66)                                | 0.97 ± 0.01 (66)                              |
| N92Q  | 0.82 ± 0.04 (12)*                                 | 0.87 ± 0.02 (12)*                             | 0.86 ± 0.05 (12)*                               | 0.88 ± 0.04 (12)*                             |
| N136Q   | 0.98 ± 0.03 (3)                                   | 0.98 ± 0.03 (3)                               | 1.02 ± 0.04 (3)                                 | 1.1 ± 0.1 (3)                                 |
| N184Q   | 0.86 ± 0.04 (6)*                                  | 0.89 ± 0.01 (6)*                              | 0.93 ± 0.02 (6)                                 | 0.86 ± 0.03 (6)*                              |
| N324Q   | 0.97 ± 0.01 (6)                                   | 1.02 ± 0.01 (6)                               | 0.99 ± 0.01 (6)                                 | 1.01 ± 0.02 (6)                               |
| N348Q   | 0.68 ± 0.02 (12)**                                | 0.86 ± 0.02 (12)*                             | 0.84 ± 0.01 (12)*                               | 0.85 ± 0.01 (12)*                             |
| N468Q   | 0.62 ± 0.04 (9)**                                 | 0.84 ± 0.03 (9)*                              | 0.79 ± 0.01 (9)**                               | 0.79 ± 0.01 (9)**                             |
| N475Q   | 1.01 ± 0.01 (3)                                   | 1.04 ± 0.02 (3)                               | 1.04 ± 0.02 (3)                                 | 0.97 ± 0.02 (3)                               |
| N585Q   | 1.01 ± 0.02 (3)                                   | 0.94 ± 0.01 (3)                               | 0.94 ± 0.02 (3)                                 | 0.89 ± 0.01 (3)                               |
| N594Q   | 0.93 ± 0.01 (3)                                   | 0.93 ± 0.01 (3)                               | 0.94 ± 0.01 (3)                                 | 0.94 ± 0.02 (3)                               |
| N663Q   | 0.05 ± 0.01 (3)**                                 | 0.51 ± 0.02 (3)**                             | 0.76 ± 0.02 (3)*                                | 0.73 ± 0.03 (3)*                              |
| N769Q   | 1.02 ± 0.02 (3)                                   | 0.94 ± 0.02 (3)                               | 0.91 ± 0.01 (3)                                 | 0.88 ± 0.01 (3)                               |
| N812Q   | 0.39 ± 0.02 (12)**                                | 0.73 ± 0.04 (12)*                             | 0.85 ± 0.04 (12)*                               | 0.81 ± 0.03 (12)*                             |
| N812A   | 0.40 ± 0.01 (3)**                                 | 0.70 ± 0.01 (3)*                              | 0.77 ± 0.01 (3)*                                | 0.77 ± 0.01 (3)*                              |
| N876Q   | 0.98 ± 0.02 (3)                                   | 0.92 ± 0.01 (3)                               | 0.98 ± 0.02 (3)                                 | 0.96 ± 0.02 (3)                               |
| N883Q   | 0.96 ± 0.02 (3)                                   | 0.93 ± 0.01 (3)                               | 0.97 ± 0.02 (3)                                 | 0.95 ± 0.02 (3)                               |
| N973Q   | 0.76 ± 0.03 (3)*                                  | 0.96 ± 0.03 (3)                               | 0.89 ± 0.04 (3)*                                | 0.81 ± 0.03 (3)*                              |
| N986Q   | 1.01 ± 0.05 (6)                                   | 0.98 ± 0.04 (6)                               | 1.03 ± 0.05 (6)                                 | 0.94 ± 0.05 (6)                               |
| N92Q/N184Q  | 0.80 ± 0.03 (6)*                                  | 0.95 ± 0.01 (6)                               | 0.88 ± 0.02 (6)*                                | 0.88 ± 0.01 (6)*                              |
| N92Q/N348Q  | 0.59 ± 0.02 (6)**                                 | 0.80 ± 0.03 (6)*                              | 0.78 ± 0.01 (6)*                                | 0.79 ± 0.02 (6)*                              |
| N92Q/N468Q  | 0.62 ± 0.05 (6)**                                 | 0.84 ± 0.02 (6)*                              | 0.80 ± 0.03 (6)*                                | 0.79 ± 0.05 (6)*                              |
| N92Q/N594Q  | 0.74 ± 0.02 (3)**                                 | 0.82 ± 0.01 (3)*                              | 0.82 ± 0.01 (3)*                                | 0.80 ± 0.01 (3)*                              |
| N92Q/N812Q  | 0.26 ± 0.01 (3)**                                 | 0.54 ± 0.01 (3)**                             | 0.67 ± 0.01 (3)**                               | 0.68 ± 0.01 (3)**                             |

|                          |                   |                   |                   |                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>N136Q/N184Q</b>       | 0.84 ± 0.02 (3)   | 0.89 ± 0.01 (3)   | 0.91 ± 0.01 (3)   | 0.97 ± 0.01 (3)   |
| <b>N136Q/N769Q</b>       | 1.13 ± 0.02 (3)   | 0.96 ± 0.01 (3)   | 0.93 ± 0.01 (3)   | 0.92 ± 0.01 (3)   |
| <b>N348Q/N468Q</b>       | 0.11 ± 0.01 (3)** | 0.47 ± 0.01 (3)** | 0.65 ± 0.01 (3)*  | 0.72 ± 0.01 (3)*  |
| <b>N348Q/N812Q</b>       | 0.04 ± 0.03 (6)** | 0.38 ± 0.01 (6)** | 0.55 ± 0.01 (6)** | 0.54 ± 0.01 (6)** |
| <b>N468Q/N812Q</b>       | 0.16 ± 0.01 (6)** | 0.53 ± 0.01 (6)** | 0.69 ± 0.01 (6)** | 0.76 ± 0.01 (6)** |
| <b>N594Q/N876Q</b>       | 0.76 ± 0.03 (3)*  | 0.82 ± 0.02 (3)*  | 0.82 ± 0.01 (3)*  | 0.82 ± 0.02 (3)*  |
| <b>N348Q/N468Q/N812Q</b> | 0.04 ± 0.03 (3)** | 0.39 ± 0.01 (3)** | 0.72 ± 0.01 (3)** | 0.74 ± 0.01 (3)** |

**TABLE 3.1.** Ca<sub>v</sub>1.2 WT was co-expressed in stable Ca<sub>v</sub>β3 HEKT cells with pmCherry- Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or mutant using a 1:1 DNA ratio (4 μg : 4 μg DNA). Flow cytometry experiments were conducted to determine cell surface expression level of tagged proteins and fluorescence intensity was measured with the FlowJo software as described in Experimental Procedures. Relative expression of Ca<sub>v</sub>α2δ1 was calculated based on ΔMean Fluorescence Intensity (ΔMFI) estimated for each fluorophore (mCherry or FITC). Details are found in the Experimental Protocols section. ΔMFI for FITC measured in intact non-permeabilized cells was used as an index of the cell surface density of the HA-tagged Ca<sub>v</sub>α2δ1 and ΔMFI for FITC measured in permeabilized cells reflect the total protein expression (cell surface and intracellular protein density). The DMFI for the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA mutants were pooled and normalized to the maximum value obtained for pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT that was expressed under the same conditions and measured the same day. The total number of experiments is provided in parentheses. The ΔMFI values for FITC measured in permeabilized cells were mostly similar to the ΔMFI for mCherry measured in intact and permeabilized cells. Furthermore, the DMFI values for mCherry measured in intact and permeabilized cells were found to be within the experimental error suggesting that cell permeabilization did not significantly alter the protein structure. Statistical analysis was carried out against the DMFI for FITC measured with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01).



| mCherry-Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA WT or mutant<br>with Ca <sub>v</sub> 1.2 WT in stable Ca <sub>v</sub> β3 cells<br>with 2 mM Ca <sup>2+</sup> |                                    |                              |  |                    |
|--|------------------------------------|------------------------------|--|--------------------|
|  | Peak current<br>density<br>(pA/pF) | E <sub>0.5,act</sub><br>(mV) | DG <sub>act</sub><br>(kcal mol <sup>-1</sup> ) | r100<br>at +5 mV   |
| empty mCherry vector   | -2.6 ± 0.4 (35)**                  | +8 ± 2 (35)**                | +0.5 ± 0.1 (35)**                              | N.D.               |
| mCherry-Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA WT   | -30 ± 1 (231)                      | -9.6 ± 0.1 (231)             | -0.86 ± 0.02 (231)                             | 0.38 ± 0.02 (231)  |
| N92Q   | -20 ± 3 (8)                        | -6.9 ± 0.6 (8)               | -0.61 ± 0.06 (8)                               | 0.26 ± 0.02 (8)    |
| N136Q  | -24 ± 6 (8)                        | -10 ± 1 (8)                  | -0.9 ± 0.1 (8)                                 | 0.26 ± 0.03 (8)    |
| N184Q  | -24 ± 5 (8)                        | -9 ± 1 (8)                   | -1.0 ± 0.3 (8)                                 | 0.32 ± 0.04 (8)    |
| N324Q  | -27 ± 5 (11)                       | -9 ± 1 (11)                  | -0.9 ± 0.3 (11)                                | 0.30 ± 0.03 (11)   |
| N348Q  | -16 ± 3 (18)*                      | -5 ± 1 (18)*                 | -0.4 ± 0.1 (18)                                | 0.42 ± 0.03 (18)   |
| N468Q  | -21 ± 1 (55)*                      | -5 ± 1 (55)*                 | -0.4 ± 0.1 (55)                                | 0.37 ± 0.02 (55)   |
| N585Q  | -19 ± 4 (9)*                       | -10.5 ± 0.8 (9)              | -1.5 ± 0.5 (9)                                 | 0.30 ± 0.02 (9)    |
| N594Q  | -34 ± 5 (8)                        | -10.3 ± 0.8 (8)              | -0.97 ± 0.09 (8)                               | 0.24 ± 0.02 (8)    |
| N663Q  | -5 ± 2 (28)**                      | +3 ± 2 (28)**                | +0.1 ± 0.1 (28)**                              | N.D.               |
| N769Q  | -32 ± 6 (8)                        | -10 ± 1 (8)                  | -1.0 ± 0.2 (8)                                 | 0.32 ± 0.03 (8)    |
| N812Q  | -9 ± 2 (30)**                      | -2 ± 1 (30)**                | -0.3 ± 0.1 (30)**                              | 0.44 ± 0.03 (30)** |
| N876Q  | -38 ± 11 (10)                      | -11 ± 2 (10)                 | -1.1 ± 0.2 (10)                                | 0.27 ± 0.03 (10)   |
| N986Q  | -30 ± 10 (12)                      | -9 ± 1 (12)                  | -0.9 ± 0.2 (12)                                | 0.31 ± 0.03 (12)   |
| N92Q/N184Q   | -18 ± 4 (10)                       | -7 ± 1 (10)                  | -0.6 ± 0.1 (10)                                | 0.34 ± 0.02 (10)   |
| N92Q/N348Q   | -11 ± 3 (7)**                      | -7 ± 1 (7)                   | -0.53 ± 0.07 (7)                               | 0.36 ± 0.03 (7)    |
| N92Q/N468Q   | -13 ± 3 (9)*                       | -6.1 ± 0.8 (9)               | -0.53 ± 0.08 (9)                               | 0.45 ± 0.03 (9)*   |
| N92Q/N594Q   | -31 ± 6 (10)                       | -10 ± 1 (10)                 | -1.1 ± 0.2 (10)                                | 0.32 ± 0.03 (10)   |
| N92Q/N812Q   | -10 ± 5 (8)**                      | -3 ± 2 (8)**                 | -0.4 ± 0.1 (8)                                 | 0.39 ± 0.03 (8)    |
| N92Q/N876Q   | -22 ± 3 (9)                        | -6 ± 1 (9)                   | -0.9 ± 0.3 (9)                                 | 0.36 ± 0.03 (9)    |
| N136Q/N184Q  | -25 ± 5 (17)                       | -7 ± 1 (17)                  | -0.5 ± 0.1 (17)                                | 0.32 ± 0.05 (17)   |
| N136Q/N769Q  | -27 ± 4 (10)                       | -7 ± 2 (10)                  | -0.6 ± 0.2 (10)                                | 0.33 ± 0.04 (10)   |
| N348Q/N468Q  | -4 ± 1 (5)**                       | +2 ± 3 (5)**                 | +0.1 ± 0.1 (5)**                               | 0.56 ± 0.03 (5)**  |

|   |                       |                       |                         |                        |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| N348Q/N812Q   | $-1.9 \pm 0.4$ (17)** | $+8 \pm 2$ (17)**     | $+0.3 \pm 0.1$ (17)**   | $0.48 \pm 0.08$ (17)** |
| N468Q/N812Q   | $-3.1 \pm 0.9$ (6)**  | $-2 \pm 2$ (6)*       | $-0.1 \pm 0.1$ (6)**    | $0.44 \pm 0.04$ (6)**  |
| N594Q/N876Q   | $-26 \pm 6$ (10)      | $-6 \pm 1$ (10)       | $-0.6 \pm 0.1$ (10)     | $0.31 \pm 0.02$ (10)   |
| N585Q/N769Q/N883Q   | $-30 \pm 4$ (8)       | $-10 \pm 1$ (8)       | $-1.0 \pm 0.2$ (8)      | $0.30 \pm 0.03$ (8)    |
| N92Q/N348Q/N594Q/N876Q  | $-29 \pm 5$ (10)      | $-11 \pm 1$ (10)      | $-1.0 \pm 0.1$ (10)     | $0.34 \pm 0.02$ (10)   |
| N585Q/N769Q/N883Q/N1066Q  | $-35 \pm 8$ (10)      | $-10.8 \pm 0.4$ (10)  | $-1.1 \pm 0.1$ (10)     | $0.28 \pm 0.04$ (10)   |
| N92Q/N184Q/N468Q/N876Q/N986Q  | $-19 \pm 3$ (25)*     | $-6.6 \pm 0.7$ (25)   | $-0.63 \pm 0.08$ (25)   | $0.32 \pm 0.03$ (25)   |
| N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/<br>N812Q/N876Q (6xNQ)   | $-5 \pm 1$ (8)**      | $+1 \pm 2$ (8)**      | $-0.2 \pm 0.7$ (8)**    | $0.41 \pm 0.02$ (8)*   |
| N184Q/N348Q/N594Q/<br>N812Q/N876Q (6xNQ+Q92N)   | $-8 \pm 2$ (10)**     | $-2 \pm 1$ (10)**     | $-0.4 \pm 0.1$ (10)**   | $0.36 \pm 0.01$ (10)*  |
| N92Q/N348Q/N594Q/<br>N812Q/N876Q (6xNQ+Q184N)   | $-8 \pm 2$ (10)**     | $-3 \pm 2$ (10)**     | $-0.6 \pm 0.1$ (10)**   | $0.36 \pm 0.02$ (10)   |
| N92Q/N184Q/N594Q/N812Q/<br>N876Q (6xNQ+Q348N)   | $-10 \pm 4$ (17)**    | $-2 \pm 2$ (17)**     | $-0.6 \pm 0.8$ (17)**   | $0.38 \pm 0.02$ (17)   |
| N92Q/N184Q/N348Q/N812Q/<br>N876Q (6xNQ+Q594N)   | $-5 \pm 2$ (10)**     | $-3 \pm 2$ (10)**     | $-0.5 \pm 0.1$ (10)**   | $0.30 \pm 0.01$ (10)   |
| N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/<br>N876Q (6xNQ + Q812N)   | $-12 \pm 2$ (19)**    | $-5.1 \pm 0.7$ (19)** | $-0.41 \pm 0.05$ (19)** | $0.37 \pm 0.01$ (19)   |
| N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/<br>N812Q (6xNQ+Q876N)   | $-3.7 \pm 0.8$ (9)**  | $+2 \pm 2$ (9)**      | $0.0 \pm 0.1$ (9)**     | $0.48 \pm 0.02$ (9)    |
| N92Q/N184Q/N468Q/N594Q/<br>N876Q/N986Q (6xNQ alt1)  | $-26 \pm 5$ (13)      | $-6 \pm 1$ (13)       | $-0.6 \pm 0.1$ (13)     | $0.3 \pm 0.1$ (13)     |
| N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/ N468Q/<br>N585Q/N594Q/N663Q/ N769Q/ N812Q/<br>N876Q/N883Q/ N986Q/N1066Q (14xNQ) | $-1.2 \pm 0.2$ (5)**  | $+11 \pm 8$ (5)**     | $+0.4 \pm 0.3$ (5)**    | N.D.                   |

**TABLE 3.2.** Ca<sub>v</sub>1.2 WT was co-expressed in stable Ca<sub>v</sub>β3 cells with pmCherry-no insert or pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or mutant using a 1:1 DNA ratio (4 μg: 4 μg DNA). Biophysical parameters were measured in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> as described elsewhere (17,22). Activation properties (E<sub>0.5,act</sub> and DGact) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation. The data are shown with the mean ± S.E.M. of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses. N.D. not determined because of a poor signal to noise ratio. Statistical analysis was carried out against the values obtained in the presence of mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01).

## 4 DISCUSSION

### 4.1 $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ possède 16 sites de glycosylation de type N

La glycosylation de type N est l'une des plus courantes modifications post-traductionnelles. Les glycosylations de type N influencent le recyclage et la stabilité des canaux ioniques cardiaques comme les canaux sodiques  $\text{Na}_v 1.7$  et  $\text{Na}_v 1.5$  (Laedermann et al. 2013, Mercier et al. 2015), ou les canaux potassiques HERG (Gong et al. 2002) où la glycosylation est essentielle à leur adressage membranaire. Dans le complexe des canaux calciques de type L  $\text{Ca}_v 1.2$ , la sous-unité auxiliaire  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  est la protéine contenant le plus de sites potentiels de glycosylation (Dolphin 2009) ce qui augmente le poids moléculaire de la protéine d'environ 50 kDa. Suite à l'isolation des cardiomyocytes avec traitement à la cytosine arabinoside qui inhibant la croissance des fibroblastes, il a été possible de déterminer que la forme complètement glycosylée de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  est présente dans les membranes plasmiques et les membranes associées. La digestion enzymatique à l'aide de la PNGase F de la protéine native dans les cardiomyocytes de souris et de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  recombinante surexprimée dans les HEKT produit une diminution de 50 kDa dans la mobilité électrophorétique de la protéine. La PNGase F est une amidase qui permet le clivage entre le résidu asparagine et le N-acétylglycosamine de la chaîne complexe d'oligosaccharides des glycoprotéines. Ceci permet d'enlever entièrement les glycans d'une protéine. Ce même déplacement est observé avec la construction 16xNQ contenant les mutations des 16 asparagines identifiées comme étant des sites potentiels de glycosylation de type N et ce sans l'aide d'une digestion enzymatique. Ainsi, chacun des sites potentiels est requis pour obtenir une protéine complètement glycosylée. De plus, les essais de mobilité électrophorétique en présence de PNGase F confirment que la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  est produite au poids moléculaire attendu malgré les nombreuses mutations des sites de glycosylation de type N.

Lors de la biogénèse de la protéine, les groupes de glucoses et mannoses sont retirés par les glycosidases et l'ajout d'autres résidus via les glycosyltransférase s'effectue dans le réticulum endoplasmique et s'étend jusqu'à l'appareil de Golgi.

Dans l'appareil de Golgi, les oligosaccharides contenant une dominance en mannose peuvent être transformés en glycans complexes ou en forme hybride (Freeze et al. 2010). Ces changements sont uniques à chaque protéine. La composition de la chaîne de glucides obtenue après la sortie de l'appareil de Golgi n'a pas été étudiée dans ce travail. Cependant, la protéine  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  a été retrouvée dans sa forme glycosylée à la membrane plasmique des cardiomyocytes et des cellules HEK293 recombinantes dans nos expériences.

Selon les essais de mobilité électrophorétique sur les mutants simples et multiples de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ , chaque séquence est associée à un glycan de 3 à 5 kDa. Les 16 séquences potentielles peuvent présenter chacune une chaîne de glucides. Par ailleurs, les séquences consensus N-X-S qui possèdent un acide aminé chargé négativement ou hydrophobe à la position X comme N136 et N184, sont considérées comme un substrat non-favorisé par le complexe oligosaccharyltransférase (Bas et al. 2011, Kasturi et al. 1997).

De plus, notre étude a montré que la glycosylation de type N joue un rôle important dans le contrôle de la densité de la protéine  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  dans la cellule et à la surface suite à des expériences de cytométrie en flux et de mobilité électrophorétique. Ceci affecte les densités de courant de  $Ca_v1.2$  obtenues en patch-clamp. Les analyses de «pulse chase» suite au traitement à la cycloheximide ont montré une cinétique de dégradation augmentée pour les mutants, ainsi la glycosylation de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  dicte la stabilité de la protéine. Ces essais ont été faits sur les mutants simples et multiples sur 16 sites consensus de glycosylation de type N (Asn à Gln). Les résultats obtenus pour des mutations multiples de ces sites en combinant les expériences d'immunofluorescences et fonctionnelles montrent que la diminution de la densité de surface de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  réduit considérablement les densités de courant et l'activation des canaux de type L  $Ca_v1.2$ .

## 4.2 La mutation N663 prévient la densité de $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ à la surface de la cellule

Parmi les 16 sites d'asparagine glycosylés qui sont tous conservés, une seule mutation sur l'asparagine 663 (N663Q) prévient la détection de la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  à la membrane cellulaire et la modulation du canal selon les observations obtenues par immunofluorescence et électrophysiologie. La substitution de l'asparagine par une glutamine n'a cependant pas empêché la synthèse de la protéine puisque la protéine est exprimée au poids moléculaire attendu. Ce site est localisé à proximité de l'épitope HA (9 résidus acides aminés) qui a été inséré à la suite de l'acide aspartique en position 676 dans la structure primaire de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . Cependant, la mutation n'a pas affecté l'accessibilité de l'épitope HA puisque celle-ci a été marquée par le fluorophore et détectée dans les cellules perméabilisées. Aucune autre mutation simple de Asn parmi les 16 sites n'a affecté d'une façon aussi critique que l'Asn663 la densité de surface ou la fonction de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .

Afin de limiter le nombre de doubles mutations à tester (120 possibilités pour les 16 sites), notre stratégie a été de produire et de caractériser des combinaisons de mutations qui ont un impact sur la fonction du canal. Les doubles mutations N348/468Q, N348/812Q et N468/812Q sont suffisantes pour empêcher la détection de la majorité des  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  à la membrane plasmique et abolir presque complètement la stimulation des courants de  $\text{Ca}_v 1.2$ . D'autres mutations doubles d'asparagine en glutamine, incluant la mutation N136Q/N184Q (Sandoval et al. 2004), n'ont pas affecté la densité de surface cellulaire ou la fonction de la protéine. Les mutations des sites N136 et N184 ont été identifiées comme étant importantes dans la modulation des courants de Baryum ( $\text{Ba}^{2+}$ ) à travers les canaux recombinants  $\text{Ca}_v 2.2$ . Une des raisons qui pourrait expliquer la contradiction entre ces deux résultats serait la différence dans le mode de régulation des canaux  $\text{Ca}_v 1.2$  et  $\text{Ca}_v 2.2$  par la sous-unité auxiliaire  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .

Les sites d'asparagine contenus dans la construction 6xNQ ont quant à eux prévenu la détection complète de la protéine à la membrane et perturbé la modulation

des courants de  $\text{Ca}_v1.2$ . Le renversement de la mutation Q348N et Q812N permet de contrer l'effet négatif sur la densité membranaire et la densité de courant de  $\text{Ca}_v1.2$ . La combinaison des sites N348Q, N468Q et N812Q avec d'autres sites montre une diminution significative de la densité membranaire et la fonction de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ , tandis que, la combinaison de n'importe quel site avec N663Q est automatiquement non fonctionnelle.

#### **4.3 L'absence de glycosylation diminue la stabilité de $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$**

Les mutations simples (N663Q) ou les mutations doubles des sites (N348, N468 et N812) ayant le plus d'impact sur la densité de surface de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  et sa fonction montrent une diminution de la stabilité selon les analyses de «pulse chase» suite au traitement à la cycloheximide. Ceci est observé par une cinétique de dégradation plus rapide que pour la protéine de type sauvage. De plus, une diminution de la quantité de protéines dans les lysats totaux chez les mutants comparé aux types sauvage est observée. La mutation N663Q a elle seule prévient la stabilité de la protéine.

Les raisons pour lesquelles la protéine mutée au niveau des glycanes est moins stable que la protéine de type sauvage ne sont pas encore élucidées. La diminution de la densité d'une protéine au niveau de la surface peut venir d'une traduction perturbée (Golzman et al. 2009, Muthusamy et al. 2015), d'un mauvais repliement de la protéine dans le réticulum endoplasmique, du mauvais tri dans le trans-Golgi, de l'augmentation de la dégradation ou de la combinaison de tous ces processus. La biogénèse de la protéine et la nature des enzymes responsables de la dégradation par le système ubiquitine-protéase de ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) (Golzman et al. 2009, Rougier et al 2014, Suzuki et al. 2014, Comyn et al. 2014) doivent être aussi identifiés. L'étude de la contribution des lectines chaperonnes qui aident directement à la maturation des glycoprotéines au niveau du RE (Pearse et al. 2010), comme la calnexine et la calreticuline, pourrait répondre à ces questions. De plus, l'identification des réseaux de contrôle de qualité affectés à ces sites spécifiques (Winchester 2005, Nakagawa et al. 2009) et des

voies de dégradation des protéines les plus fréquentes (le système ERAD et l'autophagie) (Hebert et al. 2014) serait importante.

Il a été démontré que la stabilité de la protéine KCNE1 et/ou la synthèse peuvent être diminuées lors de mutation des sites de glycosylation de type N, ce qui suggère que ce type de glycosylation est un événement co-traductionnel (Bas et al. 2011). L'observation que la protéine  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  partiellement glycosylée est moins présente dans les homogénats des cellules entières HEKT et dans les cardiomyocytes de souris est compatible avec cette hypothèse.

## **4.4 La modulation des canaux de type L**

### **4.4.1 L'interaction avec la sous-unité par $Ca_v\alpha 2\delta 1$**

L'activation des courants de type L requiert une densité importante de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  à la membrane dans les cardiomyocytes (Fuller-Bicer et al. 2009) et dans les cellules HEKT (Bourdin et al. 2015). Un changement dans la densité de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  à la surface de la cellule engendré par des mutations des sites de glycosylation de type N, des mutations impliquées dans les arythmies (Bourdin et al. 2015), des mutations situées dans le domaine structural VWA (Cassidy et al. 2014, Canti et al. 2014) ou une modulation pharmacologique (Cassidy et al. 2014, Gee et al. 1996, Hendrich et al. 2008) montre une diminution de la fonction du canal. Ces processus diminuent l'expression membranaire de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  qui se traduit par une baisse d'influx calcique dans les cardiomyocytes (Burashnikov et al. 2010, Antzelevitch et 2007, Templin et al. 2011). Il est intéressant de noter qu'une altération de la densité de la sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  dans les cellules des muscles lisses des artères est aussi associée à l'hypertension chez le rat (Bannister et al. 2012).

Tout comme les sous-unités transmembranaires régulatrices de type 1 des canaux potassiques activés par le voltage,  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  pourrait interagir avec la sous-unité qui forme le pore. Cette interaction pourrait intervenir soit au niveau du domaine senseur de voltage, tout comme KCNE et  $K_v7/KCNQ1$  (Rusic et al. 2013), ou encore à travers la portion extracellulaire de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  qui avoisine le domaine extérieur du



pore (Canti et al. 2014). Le ratio idéal pour la modulation du canal doit toujours être déterminé. Deux possibilités existent: une seule sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  interagirait avec deux  $\text{Ca}_v\alpha 1$  ou encore le complexe du canal  $\text{Ca}_v 1.2$  pourrait interagir avec une ou plusieurs  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (Plant et al. 2014). En comparaison, la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$  se lie avec une grande affinité sur un seul site de liaison situé sur la boucle I-II de la sous-unité principale des canaux HVA  $\text{Ca}_v 1$  et  $\text{Ca}_v 2$  (Bourdin et al. 2010, Shakeri et al. 2012, Berrou et al. 2002, Berrou et al. 2005, Buraei et al. 2013).

La nature des interactions protéine-protéine, les sites responsables de cette interaction et l'affinité entre  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  et  $\text{Ca}_v\alpha 1$  demande un modèle structural à haute résolution du complexe calcique de type L. À ce jour, la seule structure tridimensionnelle du complexe des canaux cardiaques  $\text{Ca}_v 1.2$  positionne la portion extracellulaire de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  au dessus du complexe mais la faible résolution de cette structure ne permet pas d'identifier les domaines d'interaction (Walsh et al. 2009).

#### **4.4.2 L'interaction par les glycanes de type N**

En plus de leur rôle dans la biogénèse des protéines et dans leur stabilité (Scott et al. 2014), les glycanes de type N permettent l'interaction avec les protéines d'adhésion cellulaire et de signalisation (Dennis et al. 2009, Wormald et al. 1999). Des avancées récentes sur la cristallographie des glycoprotéines suggèrent que la présence de glycanes de type N sur un récepteur à la surface de la cellule guide le ligand vers son site de liaison et prévient l'aggrégation de ceux-ci (Nagea et al. 2012). Ainsi, les glycanes pourraient contribuer à la modulation du canal en modifiant le potentiel de surface reconnu par la machinerie de «gating» (Pertusa et al. 2012) ou par changement conformationnel ce qui permettrait de réguler l'interaction pendant l'activation du canal (Watanabe et al. 2003). Le site N812 est un candidat pour ce genre de mécanisme. Le mutant N812Q est exprimé à la membrane plasmique à une densité similaire à celle du mutant 4xNQ, alors que la diminution de la fonction est plus importante. Ainsi, il est possible d'affirmer que la chaîne de glycanes du site Asn812 permettrait une interaction fonctionnelle avec la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$  du canal

Ca<sub>v</sub>1.2 par une interaction directe protéine-protéine ou en favorisant une conformation favorable au «gating» (Gurnett et al. 1996).

Il devient de plus en plus évident que le réseau biologique exploite les glycans à la surface des cellules pour coordonner les complexes protéiques à la membrane (Ohtsubo et al. 2006). Il est impossible à ce jour de savoir si les glycans interagissent entre eux ou avec la sous-unité Ca<sub>v</sub>α1 puisque dans la plupart des modèles prédits, le domaine extracellulaire est désordonné ce qui rend difficile la prédiction de l'orientation ou de l'interaction des glycans avec Ca<sub>v</sub>1.2. Les algorithmes structuraux ont pu identifier importants domaines mais n'ont pas permis d'obtenir un modèle tridimensionnel avec l'orientation des chaînes de glucides de type N entre eux ou avec les autres protéines du canal.

Une anomalie dans la glycosylation de la sous-unité auxiliaire transmembranaire de type I Ca<sub>v</sub>α2δ1 peut ainsi déclencher les arythmies ventriculaires et artérielles (Bourdin et al. 2015, Brundel et al. 1999) en diminuant la fraction de canaux de type Ca<sub>v</sub>1.2 fonctionnels.

## 5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons confirmé que la sous-unité auxiliaire  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  était bien glycosylée dans les cardiomyocytes et nous avons étudié le rôle des sites de glycosylation de type N sur la densité à la surface membranaire et la fonction du canal suite à l'expression de la sous-unité mutée au niveau des sites Asn dans les cellules recombinantes HEKT.

Nos résultats montrent que les 16 sites potentiels de glycosylation de type N sont tous impliqués dans le processus. Cependant, certains sites Asn particuliers entraînent une plus grande variation au niveau de la stabilité de la protéine. La mutation de 6 sites de glycosylation de la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  prévient significativement sa densité de surface, sa stabilité et sa fonction. L'inversion des mutations N348Q et N812Q dans la construction contenant 6 Asn mutés permet une récupération de la fonction de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . De plus, pailler deux sites mutés (N348Q, N468Q et/ou N812Q) diminuent la stabilité, la synthèse, la densité de surface de la protéine et diminuent les courants de type L. La mutation simple N663Q quant à elle montre toutes ces caractéristiques à elle seule, tout en étant encore faiblement produite dans la cellule. Ces résultats obtenus montrent que Asn663, et avec un moins grand impact Asn348, Asn468 et Asn812, contribuent grandement à la stabilité fonctionnelle de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .

Il y a beaucoup de perspectives de recherche suite aux résultats obtenus, car les voies moléculaires et cellulaires impliquées dans la perte de stabilité suite aux mutations des sites Asn dans  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  ne sont pas encore entièrement élucidées. Il serait intéressant d'étudier la contribution des voies de dégradation de la protéine, soit le système ERAD et l'autophagie. Plus précisément, le système ubiquitine-protéase, impliquant des lectines chaperones identifiées pour la maturation des glycoprotéines. De plus, le processus de modulation entre  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  et les canaux  $\text{Ca}_v 1.2$  n'est pas encore résolu. L'obtention de la structure et des sites d'interaction entre la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  et la sous-unité formeuse de pore  $\text{Ca}_v\alpha 1$  serait une grande avancée dans le domaine.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

- Adams BA, Beam KG (1990) *Muscular dysgenesis in mice: a model system for studying excitation-contraction coupling*. FASEB J. (10):2809-16.
- Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., and Molinari, M. (2010). *N-glycan structures: recognition and processing in the ER*. Trends in Biochemical Sciences **35**, 74-82
- Altier, C., A. Garcia-Caballero, B. Simms, H. You, L. Chen, J. Walcher, H. W. Tedford, T. Hermosilla and G. W. Zamponi (2011). *"The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels."* Nat Neurosci **14**(2): 173-180.
- Anantharaman, V. and Aravind, L. (2000) *Cache a signalling domain common to animal Ca<sup>2+</sup> channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors*. Trends Biochem. Sci. 25, 535–537
- Andrade, A., Sandoval, A., Oviedo, N., De, W. M., Elias, D., and Felix, R. (2007). *Proteolytic cleavage of the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_2\delta$  subunit: structural and functional features*. Eur. J. Neurosci. **25**, 1705-1710
- Antzelevitch, C., G. D. Pollevick, J. M. Cordeiro, O. Casis, M. C. Sanguinetti, Y. Aizawa, A. Guerchicoff, R. Pfeiffer, A. Oliva, B. Wollnik, P. Gelber, E. P. Bonaros, Jr., E. Burashnikov, Y. Wu, J. D. Sargent, S. Schickel, R. Oberheiden, A. Bhatia, L. F. Hsu, M. Haissaguerre, R. Schimpf, M. Borggrefe and C. Wolpert (2007). *"Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death."* Circulation **115**(4): 442- 449.
- Arikkath, J. and K. P. Campbell (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. Curr Opin Neurobiol 13(3): 298-307.
- Arikkath J, Chen CC, Ahern C, Allamand V, Flanagan JD, Coronado R, Gregg RG, Campbell KP.(2003) *Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels*. J Biol Chem. 10;278(2):1212-9.
- Arking DE, Pulit SL, Crotti L, van der Harst P, Munroe PB, Koopmann TT, Sotoodehnia N, Rossin EJ, Morley M, Wang X, Johnson AD, Lundby A, Gudbjartsson DF, Noseworthy PA, Eijgelsheim M, Bradford Y, Tarasov KV, Dörr M, Müller-Nurasyid M, Lahtinen AM, Nolte IM, Smith AV, Bis JC, Isaacs A, Newhouse SJ, Evans DS, Post WS, Waggott D, Lyytikäinen LP, Hicks AA, Eisele L, Ellinghaus D, Hayward C, Navarro P, Ulivi S, Tanaka T, Tester DJ, Chatel S, Gustafsson S, Kumari M, Morris RW, Naluai AT, Padmanabhan S, Kluttig A, Strohmer B, Panayiotou AG, Torres M, Knoflach M, Hubacek JA,

Slowikowski K, Raychaudhuri S, Kumar RD, Harris TB, Launer LJ, Shuldiner AR, Alonso A, Bader JS, Ehret G, Huang H, Kao WH, Strait JB, Macfarlane PW, Brown M, Caulfield MJ, Samani NJ, Kronenberg F, Willeit J; CARE Consortium; COGENT Consortium, Smith JG, Greiser KH, Meyer Zu Schwabedissen H, Werdan K, Carella M, Zelante L, Heckbert SR, Psaty BM, Rotter JI, Kolcic I, Polašek O, Wright AF, Griffin M, Daly MJ; DCCT/EDIC, Arnar DO, Hólm H, Thorsteinsdottir U; eMERGE Consortium, Denny JC, Roden DM, Zuvich RL, Emilsson V, Plump AS, Larson MG, O'Donnell CJ, Yin X, Bobbo M, D'Adamo AP, Iorio A, Sinagra G, Carracedo A, Cummings SR, Nalls MA, Jula A, Kontula KK, Marjamaa A, Oikarinen L, Perola M, Porthan K, Erbel R, Hoffmann P, Jöckel KH, Kälisch H, Nöthen MM; HRGEN Consortium, den Hoed M, Loos RJ, Thelle DS, Gieger C, Meitinger T, Perz S, Peters A, Prucha H, Sinner MF, Waldenberger M, de Boer RA, Franke L, van der Vleuten PA, Beckmann BM, Martens E, Bardai A, Hofman N, Wilde AA, Behr ER, Dalageorgou C, Giudicessi JR, Medeiros-Domingo A, Barc J, Kyndt F, Probst V, Ghidoni A, Insolia R, Hamilton RM, Scherer SW, Brandimarto J, Margulies K, Moravec CE, del Greco M F, Fuchsberger C, O'Connell JR, Lee WK, Watt GC, Campbell H, Wild SH, El Mokhtari NE, Frey N, Asselbergs FW, Mateo Leach I, Navis G, van den Berg MP, van Veldhuisen DJ, Kellis M, Krijthe BP, Franco OH, Hofman A, Kors JA, Uitterlinden AG, Witteman JC, Kedenko L, Lamina C, Oostra BA, Abecasis GR, Lakatta EG, Mulas A, Orrú M, Schlessinger D, Uda M, Markus MR, Völker U, Snieder H, Spector TD, Ärnlöv J, Lind L, Sundström J, Syvänen AC, Kivimäki M, Kähönen M, Mononen N, Raitakari OT, Viikari JS, Adamkova V, Kiechl S, Brion M, Nicolaidis AN, Paulweber B, Haerting J, Dominiczak AF, Nyberg F, Whincup PH, Hingorani AD, Schott JJ, Bezzina CR, Ingelsson E, Ferrucci L, Gasparini P, Wilson JF, Rudan I, Franke A, Mühleisen TW, Pramstaller PP, Lehtimäki TJ, Paterson AD, Parsa A, Liu Y, van Duijn CM, Siscovick DS, Gudnason V, Jamshidi Y, Salomaa V, Felix SB, Sanna S, Ritchie MD, Stricker BH, Stefansson K, Boyer LA, Cappola TP, Olsen JV, Lage K, Schwartz PJ, Kääb S, Chakravarti A, Ackerman MJ, Pfeufer A, de Bakker PI, Newton-Cheh C. (2014) *Genetic association study of QT interval highlights role for calcium signaling pathways in myocardial repolarization*. Nat Genet.

Aschar-Sobbi, R., Izaddoustdar, F., Korogyi, A. S., Wang, Q., Farman, G. P., Yang, F., Yang, W., Dorian, D., Simpson, J. A., Tuomi, J. M., Jones, D. L., Nanthakumar, K., Cox, B., Wehrens, X. H. T., Dorian, P., and Backx, P. H. (2015). *Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNFalpha*. Nat. Commun. **6**, 6018

Baig SM, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, Nürnberg G, Ali A, Ahmad I, Sinnegger-Brauns MJ, and Brandt N, et al. (2011) *Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness*. Nat Neurosci 14:77–84.

Bannister JP, Adebiyi A, Zhao G, Narayanan D, Thomas CM, Feng JY, and Jaggar

- JH (2009) *Smooth muscle cell alpha2delta-1 subunits are essential for vaso-regulation by CaV1.2 channels.* Circ Res 105:948–955.
- Bannister, J. P., Bulley, S., Narayanan, D., Thomas-Gatewood, C., Luzny, P., Pachuau, J., and Jaggar, J. H. (2012). *Transcriptional Upregulation of alpha2delta1 Elevates Arterial Smooth Muscle Cell Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Surface Expression and Cerebrovascular Constriction in Genetic Hypertension.* Hypertension **60**, 1006-1015
- Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman SL, Letts VA, Brodbeck J, Canti C, Meir A, Page KM, and Kusumi K, et al. (2001) *Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the Cacna2d2 gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells.* J Neurosci 21:6095–6104.
- Barrett, C. F. and R. W. Tsien (2008). *"The Timothy syndrome mutation differentially affects voltage- and calcium-dependent inactivation of CaV1.2 L-type calcium channels."* Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2157-2162.
- Bas, T., Gao, G. Y., Lvov, A., Chandrasekhar, K. D., Gilmore, R., and Kobertz, W. R. (2011). *Post-translational N-Glycosylation of Type I Transmembrane KCNE1 Peptides: IMPLICATIONS FOR MEMBRANE PROTEIN BIOGENESIS AND DISEASE.* J. Biol. Chem. **286**, 28150-28159
- Beam KG, Knudson CM, Powell JA. (1986) *A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells.* Nature.168-70. PubMed PMID: 2419767.
- Bejarano, E. and Cuervo, A. M. (2010) *Chaperone-mediated autophagy.* Proc. Am.Thorac. Soc. **7**, 29–39
- Benaroudj N, Zwickl P, Seemuller E, Baumeister W, Goldberg AL: *ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation.* Mol Cell 11: 69–78, 2003
- Berridge, M., P. Lipp and M. Bootman (1999). *"Calcium signalling."* Curr Biol **9**(5): R157-159.
- Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). *"The versatility and universality of calcium signalling."* Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003). *"Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling."* Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.

- Berrou, L., Klein, H., Bernatchez, G., and Parent, L. (2002). *A Specific Tryptophan in the I-II Linker Is a Key Determinant of  $\beta$ -Subunit Binding and Modulation in CaV2.3 calcium channels.* Biophys. J **83**, 1429-1442
- Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Tousignant, A., Dafi, O., Pelletier, J. N., and Parent, L. (2005). *The C-terminal residues in the  $\alpha$ -interacting domain (AID) helix anchor CaV  $\beta$  subunit interaction and modulation of CaV2.3 channels.* J. Biol. Chem. **280**, 494-505
- Bers, D.M. (2000). *Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction.* Circ Res **87**, 275-281
- Bers DM. (2002) *Cardiac excitation-contraction coupling.* Nature. 198-205. Review.
- Bezanilla, F. (2002). *Voltage sensor movements.* J Gen Physiol 120(4): 465- 473.
- Bhat S, Dao DT, Terrillion CE, Arad M, Smith RJ, Soldatov NM, and Gould TD (2012) *CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease.* Prog Neurobiol 99:1–14.
- Bichet, D., V. Cornet, S. Geib, E. Carlier, S. Volsen, T. Hoshi, Y. Mori and M. De Waard (2000). *The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the  $\beta$  subunit.* Neuron 25(1): 177-190.
- Birnbaumer, L., K. P. Campbell, W. A. Catterall, M. M. Harpold, F. Hofmann, W. A. Horne, Y. Mori, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe and et al. (1994). *"The naming of voltage-gated calcium channels."* Neuron **13**(3): 505-506.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (2004). *Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence.* Proteomics. **4**, 1633-1649
- Boczek NJ, Miller EM, Ye D, Nesterenko VV, Tester DJ, Antzelevitch C, Czosek RJ, Ackerman MJ, and Ware SM (2015) *Novel Timothy syndrome mutation leading to increase in CACNA1C window current.* Heart Rhythm 12:211–219.
- Boitano, S., E. R. Dirksen and M. J. Sanderson (1992). *Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate.* Science **258**(5080): 292-295.
- Bourdin B, Marger F, Wall-Lacelle S, Schneider T, Klein H, Sauvé R, Parent L. (2010) *Molecular determinants of the CaV $\beta$ -induced plasma membrane targeting of the CaV1.2 channel.* J Biol Chem.; 285(30):22853-63.

- Bourdin, B., Shakeri, B., Tetreault, M. P., Sauve, R., Lesage, S., and Parent, L. (2015). *Functional Characterization of CaV $\alpha$ 2 $\delta$  Mutations Associated with Sudden Cardiac Death*. *J. Biol. Chem.* **290**, 2854-2869
- Brice, N. L., N. S. Berrow, V. Campbell, K. M. Page, K. Brickley, I. Tedder and A. C. Dolphin (1997). *Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody*. *Eur J Neurosci* 9(4): 749-759.
- Brodbeck J, Davies A, Courtney J-M, Meir A, Balaguero N, Canti C, Moss FJ, Page KM, Pratt WS, and Hunt SP, et al. (2002) *The ducky mutation in Cacna2d2 results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated alpha 2 delta-2 protein with abnormal function*. *J Biol Chem* 277: 7684–7693.
- Brundel, B. J. J. M., Van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Deelman, L. E., Tieleman, R. G., Grandjean, J. G., Van Gilst, W. H., and Crijns, H. J. G. M. (1999). *Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res* **42**, 443-454
- Brust PF, Simerson S, McCue AF, Deal CR, Schoonmaker S, Williams ME, Veliçelebi G, Johnson EC, Harpold MM, Ellis SB.(1993) *Human neuronal voltage-dependent calcium channels: studies on subunit structure and role in channel assembly*. *Neuropharmacology*. (11):1089-102.
- Buraei, Z. and Yang, J. (2013). *Structure and function of the beta subunit of voltage-gated calcium channels*. *Biochimica. et Biophysica. Acta (BBA.)-Biomembranes*. 1828, 1530-1540
- Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpon, E., Hu, D., Desai, M., Borggreffe, M., Haissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G. D., Guerchicoff, A., Laino, R., Marieb, M., Nademanee, K., Nam, G. B., Robles, R., Schimpf, R., Stapleton, D. D., Viskin, S., Winters, S., Wolpert, C., Zimmern, S., Veltmann, C., and Antzelevitch, C. (2010). *Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death*. *Heart Rhythm*. **7**, 1872-1882
- Cantí C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Heblich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, and Davies A, et al. (2005) *The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11230–11235.



- Carafoli, E., L. Santella, D. Branca and M. Brini (2001). *"Generation, control, and processing of cellular calcium signals."* Crit Rev Biochem Mol Biol **36**(2): 107-260.
- Carl, S. L., Felix, K., Caswell, A. H., Brandt, N. R., Ball, W. J., Jr., Vaghy, P. L., Meissner, G., and Ferguson, D. G. (1995). *Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium.* J. Cell Biol. **129**, 673-682
- Cassidy, J. S., Ferron, L., Kadurin, I., Pratt, W. S., and Dolphin, A. C. (2014). *Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary alpha2 delta 1 subunits.* Proceedings of the National Academy of Sciences **111**, 8979-8984
- Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L., and Perez-Reyes, E. (1993). *Cloning and expression of a third calcium channel  $\beta$  subunit.* J. Biol. Chem. **268**, 3450-3455
- Catterall, W. A. (2000). *Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **16**, 521-555
- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch and J. Striessnig (2005). *"International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels."* Pharmacol Rev **57**(4): 411-425.
- Catterall, W. A. (2011). *"Voltage-gated calcium channels."* Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(8): a003947.
- Cavalié, A., Pelzer, D., and Trautwein, W. (1986). *Fast and slow gating behaviour of single calcium channels in cardiac cells. Relation to activation and inactivation of calcium-channel current.* Pflügers Arch. **406**:241-258.
- Cerrone M, Napolitano C, Priori SG.(2012) *Genetics of ion-channel disorders.* Curr Opin Cardiol. ;27(3):242-52. doi: 10.1097/HCO.0b013e328352429d. Review.
- Chang, F. C. and Hosey, M. M. (1988). *Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different.* J. Biol. Chem. **263**, 18929-18937
- Chen ZJ, Sun LJ. (2009) *Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling.* Mol Cell. **33**(3):275-86. Review.
- Ciechanover A, Ben-Saadon R (2004) *N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in.* Trends Cell Biol. 2004; **14**: 103-6

- Clark, R. B., Tremblay, A., Melnyk, P., Allen, B. G., Giles, W. R., and Fiset, C. (2001). *T-tubule localization of the inward-rectifier K(+) channel in mouse ventricular myocytes: a role in K(+) accumulation.* J. Physiol. **537**, 979-992
- Cohen P. (2000) *The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update.* Trends Biochem Sci. 25, 596-601
- Cohen, S. A. and Levitt, L. K. (1993). *Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies.* Circ Res **73**, 735-742
- Comyn, S. A., Chan, G. T., and Mayor, T. (2014). *False start: Cotranslational protein ubiquitination and cytosolic protein quality control.* Journal of Proteomics. **100**, 92-101
- Curtis, B. M. and W. A. Catterall (1986). *"Reconstitution of the voltage- sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules."* Biochemistry **25**(11): 3077-3083.
- Dai, S., Hall, D. D., and Hell, J. W. (2009). *Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels.* Physiol Rev. **89**, 411-452
- Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Tran Van, M. A., Foucault, I., Koch, D., Pratt, W. S., Saibil, H. R., and Dolphin, A. C. (2006). *The calcium channel  $\alpha_2\delta_2$  subunit partitions with Cav2.1 into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function.* J. Neurosci. **26**, 8748-8757
- Davies A, Hendrich J, Van Minh AT, Wratten J, Douglas L, Dolphin AC. (2007) *Functional biology of the  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels.* Trends Pharmacol Sci. ;28(5):220-8.. Review.
- Davies, A., I. Kadurin, A. Alvarez-Laviada, L. Douglas, M. Nieto-Rostro, C. S. Bauer, W. S. Pratt and A. C. Dolphin (2010). *"The  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function."* Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1654-1659.
- Dennis, J. W., Nabi, I. R., and Demetriou, M. (2009). *Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease.* Cell **139**, 1229-1241
- Deribe YL, Pawson T, Dikic I. (2010) *Post-translational modifications in signal integration.* Nat Struct Mol Biol. 17(6):666-72. doi: 10.1038/nsmb.1842. Review.

- Di Biase V, Obermair GJ, Szabo Z, Altier C, Sanguesa J, Bourinet E, Flucher BE.(2008) *Stable membrane expression of postsynaptic CaV1.2 calcium channel clusters is independent of interactions with AKAP79/150 and PDZ proteins.* J Neurosci.; 28(51):13845-55.
- Dolmetsch, R. (2003). *"Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus."* Sci STKE (166): PE4.
- Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME.(2001) *Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway.* Sci STKE 294(5541):333-9.
- Dolphin AC, Wyatt CN, Richards J, Beattie RE, Craig P, Lee JH, Cribbs LL, Volsen SG, and Perez-Reyes E (1999) *The effect of alpha2-d and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G.* J Physiol 519:35–45.
- Dolphin, A. C. (2009). *Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits.* Curr. Opin. Neurobiol. **19**, 237-244
- Dolphin, A. C. (2013). *The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1828**, 1541-1549
- Dong, Z., P. Saikumar, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam (2006). *Calcium in cell injury and death.* Annu Rev Pathol 1: 405-434.
- Dostal, D. E. and K. M. Baker (1998). *Angiotensin and endothelin: messengers that couple ventricular stretch to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and cardiac hypertrophy.* Circ Res **83**(8): 870-873.
- Douglas, L., Page, K. M., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2005). *The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of a2d subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102**, 11230-11235
- Douglas, L., Davies, A., Wratten, J., and Dolphin, A. C. (2006). *Do voltage-gated calcium channel alpha2delta subunits require proteolytic processing into alpha2 and delta to be functional?* Biochem. Soc. Trans. **34**, 894-898
- Du, D., Yang, H., Norring SA - Bennett, E., and Bennett, E. S. (2014). *In-silico modeling of glycosylation modulation dynamics in hERG ion channels and cardiac electrical signals.* IEEE J Biomed Health Inform **18**, 205-214
- Dunlap, K., J. I. Luebke and T. J. Turner (1995). *"Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons."* Trends Neurosci **18**(2): 89-98.

- Ellis, S. B., M. E. Williams, N. R. Ways, R. Brenner, A. H. Sharp, A. T. Leung, K. P. Campbell, E. McKenna, W. J. Koch, A. Hui and et al. (1988). "*Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel.*" Science **241**(4873): 1661-1664.
- Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, and Huberman AD, et al. (2009) *Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis.* Cell 139:380–392.
- Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez- Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien and W. A. Catterall (2000). "*Nomenclature of voltage-gated calcium channels.*" Neuron **25**(3): 533-535.
- Ferguson, M.A.J., Kinoshita, T., and Hart, G.W. (2009). *Glycosylphosphatidylinositol Anchors*. In *Essentials of Glycobiology*, Second Edition, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 143–161.
- Flynn JT, Pasko DA.(2000) *Calcium channel blockers: pharmacology and place in therapy of pediatric hypertension.* Pediatr Nephrol. (3-4):302-16. Review.
- Fox, A. P., M. C. Nowycky and R. W. Tsien (1987). "*Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones.*" J Physiol **394**: 149-172.
- Freeze, H. H., and Elbein, A. D. (2009) *Essentials of Glycobiology* Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., and Bertozzi, C. R., eds) 2nd Ed., pp. 47–61, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Freeze, H. H. and Kranz, C. (2010). *Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans.* Curr Protoc Protein Sci. **Chapter 12**, Unit 12.4
- Freeze HH. (2013) *Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge.* J Biol Chem.8;288(10):6936-45.. Review.
- Fujita, M., and Kinoshita, T. (2012). *GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics.* Biochim. Biophys. Acta 1821, 1050–1058.
- Fukuyama M, Wang Q, Kato K, Ohno S, Ding WG, Toyoda F, Itoh H, Kimura H, Makiyama T, and Ito M, et al. (2014) *Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes.*

Europace 16:1828–1837.

- Fuller-Bicer, G. A., Varadi, G., Koch, S. E., Ishii, M., Bodi, I., Kadeer, N., Muth, J. N., Mikala, G., Petrashevskaya, N. N., Jordan, M. A., Zhang, S. P., Qin, N., Flores, C. M., Isaacsohn, I., Varadi, M., Mori, Y., Jones, W. K., and Schwartz, A. (2009). Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha_2/d_1$  subunit. Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol **297**, H117-H124
- Ganong W. (2005), *Physiologie médicale*, De Boeck Supérieur, Aug 17, 2005 -page 76. 849 pages
- Gao, T., Puri, T. S., Gerhardstein, B. L., Chien, A. J., Green, R. D., and Hosey, M. M. (1997). *Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes*. J. Biol. Chem. **272**, 19401-19407
- Gee, N. S., Brown, J. P., Dissanayake, V. U., Offord, J., Thurlow, R., and Woodruff, G. N. (1996). *The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the  $\alpha_2\delta$  subunit of a calcium channel*. J. Biol. Chem. **271**, 5768-5776
- Gillis J, Burashnikov E, Antzelevitch C, Blaser S, Gross G, Turner L, Babul-Hirji R, and Chitayat D (2012) *Long QT, syndactyly, joint contractures, stroke and novel CACNA1C mutation: expanding the spectrum of Timothy syndrome*. Am J Med Genet A 158A:182–187.
- Glauner K.S., L.M. Mannuzzu, C.S. Gandhi and Y.E. Isacoff (1999). *Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel*. Nature 402(6763):813-817.
- Glickman MH, Ciechanover A. (2002) *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway:destructionfor the sake of construction*. Physiol Rev. (2):373-428.Review.
- Goldberg AL (2003) *Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins*. Nature 426: 895–899
- Glozman, R., Okiyoneda, T., Mulvihill, C. M., Rini, J. M., Barriere, H., and Lukacs, G. L. (2009). *N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic*. The Journal of Cell Biology **184**, 847-862
- Gomez-Ospina, N., F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu and R. Dolmetsch (2006). *The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel  $Ca(V)1.2$  encodes a transcription factor*. Cell 127(3): 591-606.

- Gong, Q., Anderson, C. L., January, C. T., and Zhou, Z. (2002). *Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **283**, H77-H84
- Grandy, S. A., Trepanier-Boulay, V., and Fiset, C. (2007). *Postnatal development has a marked effect on ventricular repolarization in mice*. Am J Physiol Heart Circ. Physiol **293**, H2168-H2177
- Guénard, H. (2001). *Physiologie humaine* sous la dir. de Hervé Guénard ill. de Corinne Boudon. Rueil-Malmaison, Pradel.
- Gurnett, C. A., De Waard, M., and Campbell, K. P. (1996). *Dual Function of the Voltage-Dependent Calcium Channel  $\alpha 2\delta$  Subunit in Current Stimulation and Subunit Interaction*. Neuron **16**, 431-440
- Györke S., Hagen B. M., Terentyev D., Lederer W. J. (2007) *Chain-reaction Ca signaling in the heart*. J. Clin. Invest. **117**, 1758–1762
- Cerrone M., Napolitano C., Priori S. G. (2012) Genetics of ion-channel disorders. Curr. Opin. Cardiol. **27**, 242–252
- Hamilton KS, Ellison MJ, Shaw GS. (2000) *Identification of the ubiquitin interfacial residues in a ubiquitin-E2 covalent complex*. J Biomol NMR.;18(4):319-27.
- He, C. and Klionsky, D. J. (2009) *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu. Rev. Genet. **43**, 67–93
- Hebert, D. N. and Molinari, M. (2012). *Flagging and docking: dual roles for N-glycans in protein quality control and cellular proteostasis*. Trends in Biochemical Sciences **37**, 404-410
- Hendrich, J., Van Minh, A. T., Heblich, F., Nieto-Rostro, M., Watschinger, K., Striessnig, J., Wratten, J., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2008). *Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the  $\alpha 2\delta$  ligand gabapentin*. Proceedings of the National Academy of Sciences **105**, 3628-3633
- Hennessey JA, Boczek NJ, Jiang YH, Miller JD, Patrick W, Pfeiffer R, Sutphin BS, Tester DJ, Barajas-Martinez H, and Ackerman MJ, et al. (2014) *A CACNA1C variant associated with reduced voltage-dependent inactivation, increased CaV1.2 channel window current, and arrhythmogenesis*. PLoS One 9:e106982.
- Hess P, Lansman JB, Tsien RW. (1984) Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. Nature. 311(5986):538-44

- Hofmann F., L. Lacinova and N. Klugbauer (1999). *Voltage-dependent calcium channels: from structure to function*. Rev physiol, biochem pharmacol 139:33-87.
- Hoppa M, Lana B, Margas W, Dolphin AC, and Ryan TA (2012) *a2d expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability*. Nature 486: 122–125.
- Inamori, K., Yoshida-Moriguchi, T., Hara, Y., Anderson, M. E., Yu, L., and Campbell, K. P. (2012) *Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE*. Science 335, 93–96
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004) *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature. 431, 931-45.
- Ioffe, E. and Stanley, P. (1994). *Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates*. Proc Natl Acad Sci U S A **91**, 728-732
- Ikonnikov G, Yelle D. (2012) *Physiology of cardiac conduction and contractility*. McMaster Pathophysiology Review
- Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, Yamrom B, Lee YH, Narzisi G, and Leotta A, et al. (2012) *De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum*. Neuron 74:285–299.
- Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP. (1990) *Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle*. Science. 27;248(4954):490-2.
- Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., and Campbell, K. P. (1991). *Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel  $\alpha_2$ -subunit and the associated d peptides*. J. Biol. Chem. **266**, 3287-3293
- Jenkins MA, Christel CJ, Jiao Y, Abiria S, Kim KY, Usachev YM, Obermair GJ, Colbran RJ, Lee A. (2010)  *$\text{Ca}^{2+}$ - dependent facilitation of Cav1.3  $\text{Ca}^{2+}$  channels by densin and  $\text{Ca}^{2+}$  /calmodulin-dependent protein kinase II*. J Neurosci 30:5125–5135.
- Jensen O. N. (2004) *Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry*. Curr Opin Chem Biol. 8, 33-41.

- Johnson JN, Ackerman MJ. (2009) *QTc: how long is too long?* Br J Sports Med. 43(9):657-62. doi: 10.1136/bjsm.2008.054734. Review.
- Jurkat-Rott K, Lerche H, and Lehmann-Horn F (2002) *Skeletal muscle channelopathies.* J Neurol 249:1493–1502.
- Kamp, T. J. and Hell, J. W. (2000). *Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C.* Circ. Res. **87**, 1095-1102
- Kang, M. G. and K. P. Campbell (2003). *"Gamma subunit of voltage- activated calcium channels."* J Biol Chem **278**(24): 21315-21318.
- Kasturi, L., Chen, H., and Shakin-Eshleman, S. H. (1997). *Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors.* Biochem. J. **323**, 415-419
- Kirisako T, Kamei K, Murata S, Kato M, Fukumoto H, Kanie M, Sano S, Tokunaga F, Tanaka K, Iwai K. (2006) *A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains.* EMBO J.;25(20):4877-87.
- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL (1999) *The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation.* J Biol Chem 274: 3363–3371
- Klugsbauer, N., L. Lacinova, E. Marais, M. Hobom and F. Hofmann (1999). *"Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit."* J Neurosci **19**(2): 684-691.
- Klugsbauer N, Marais E, and Hofmann F (2003) *Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding.* J Bioenerg Biomembr 35: 639–647. Science & Business Media, Berlin.
- Kraft C, Peter M, Hofmann K. *Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond.* Nat Cell Biol. 2010 Sep;12(9):836-41
- Lacinova, L. (2005). *Voltage-dependent calcium channels.* Gen Physiol Biophys 24 Suppl 1: 1-78.
- Laedermann, C. J., Syam, N., Decosterd, I., and Abriel, H. (2013). *beta1- and beta3-voltage-gated sodium channel subunits modulate cell surface expression and glycosylation of Nav1.7 in HEK293 cells.* Frontiers in Cellular Neuroscience **7**,137



- Lamb CA, Dooley HC, Tooze SA. (2013) *Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation*. Bioessays. (1):34-45.
- Lamb GD.(2000) *Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 27(3):216-24. Review.
- Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. (2006) *Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*. J Am Soc Nephrol. (7):1807-19. Review.
- Lee, G. H., Badorff, C., and Knowlton, K. U. (2000). Dissociation of Sarcoglycans and the Dystrophin Carboxyl Terminus From the Sarcolemma in Enteroviral Cardiomyopathy. Circ Res **87**, 489-495
- Lin NY, Beyer C, Giessel A, Kireva T, Scholtyssek C, Uderhardt S, Munoz LE, DeesC, Distler A, Wirtz S, Krönke G, Spencer B, Distler O, Schett G, Distler JH. (2013) *Autophagy regulates TNF $\alpha$ -mediated joint destruction in experimental arthritis*.Ann Rheum Dis. 72(5):761-8.
- Lizotte, E., Tremblay, A. F., Allen BG, and Fiset, C. (2005). Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. Anal. Biochem **345**, 47-54
- Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., and Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology*, 4th edition,.New York: W. H. Freeman; ISBN-10: 0-7167-3136-3
- Logothetis D.E., S. Movahedi, C. Satler, K. Lindpaintner and B. Nadal- Ginard (1992). *Incremental reductions of positive charge within the S4 region of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel result in corresponding decreases in gating charge*. Neuron 8(3):531-540.
- Lu, J., Robinson, J. M., Edwards, D., and Deutsch, C. (2001). *T1-T1 interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes*. Biochemistry. **40**, 10934-10946
- Lugenbiel, P., Wenz, F., Govorov, K., Schweizer, P. A., Katus, H. A., and Thomas, D. (2015). *Atrial Fibrillation Complicated by Heart Failure Induces Distinct Remodeling of Calcium Cycling Proteins*. PLoS ONE **10**, e0116395
- Mani A, Gelmann EP.(2005) *The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer*. J Clin Oncol 23(21):4776–89.
- Mansergh, F., N. C. Orton, J. P. Vessey, M. R. Lalonde, W. K. Stell, F. Tremblay, S. Barnes, D. E. Rancourt and N. T. Bech-Hansen (2005). *"Mutation of the*

- calcium channel gene Cacna1f disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina."* Hum Mol Genet **14**(20): 3035-3046.
- Marais, E., Klugbauer, N., and Hofmann, F. (2001). *Calcium Channel alpha2delta Subunits: Structure and Gabapentin Binding.* Molecular Pharmacology **59**, 1243-1248
- Markkanen, P. M. H. and Petaja-Repo, U. E. (2008). *N-Glycan-mediated Quality Control in the Endoplasmic Reticulum Is Required for the Expression of Correctly Folded delta-Opioid Receptors at the Cell Surface.* J. Biol. Chem. **283**, 29086-29098
- McKeown, L., P. Robinson and O. T. Jones (2006). *"Molecular basis of inherited calcium channelopathies: role of mutations in pore-forming subunits."* Acta Pharmacol Sin **27**(7): 799-812.
- Mercier, A., Clement, R., Harnois, T., Bourmeyster, N., Bois, P., and Chatelier, A. (2015). *Nav1.5 channels can reach the plasma membrane through distinct N-glycosylation states.* Biochimica. et Biophysica. Acta (BBA) General. Subjects. **1850**, 1215-1223
- Meyers, M. B., T. S. Puri, A. J. Chien, T. Gao, P. H. Hsu, M. M. Hosey and G. I. Fishman (1998). *"Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> channels."* J Biol Chem **273**(30): 18930-18935.
- Miller D.J. (2005) *Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart* J Physiol.
- Mizushima N.(2007) *Autophagy: process and function.* Genes Dev 21:2861–73.
- Mori M.X., Vander Kooi C.W., Leahy D.J., Yue D.T. (2008) *Crystal structure of the CaV2 IQ domain in complex with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin: high-resolution mechanistic implications for channel regulation by Ca<sup>2+</sup>.* Structure. 16:607–620 10.1016/j.str.2008.01.011
- Mortimore, G. E., Hutson, N. J. and Surmacz, C. A. (1983) *Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 2179–2183
- Mukherjee, R. and Spinale, F. G. (1998). *L-type Calcium Channel Abundance and Function with Cardiac Hypertrophy and Failure: A Review.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology **30**, 1899-1916
- Muntoni, F., Torelli, S., and Brockington, M. (2008) *Muscular dystrophies due to glycosylation defects.* Neurotherapeutics 5, 627–632

- Muthusamy, S., Malhotra, P., Hosameddin, M., Dudeja, A. K., Borthakur, S., Saksena, S., Gill, R. K., Dudeja, P. K., and Alrefai, W. A. (2015). *N-glycosylation is essential for ileal ASBT function and protection against proteases*. American Journal of Physiology - Cell Physiology **308**, C964-C971
- Nadolski MJ, Linder ME. (2007) *Protein lipidation*. FEBS J. 274(20):5202-10. Review.
- Nagae, M. and Yamaguchi, Y. (2012). *Function and 3D Structure of the N-Glycans on Glycoproteins*. Int. J. Mol. Sci. **13**, 8398-8429
- Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Toyoda, Y., Koshiba, S., and Ishikawa, T. (2009). *Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2*. FEBS Journal **276**, 7237-7252
- Napolitano C, Antzelevitch C. (2011) *Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel*. Circ Res. 4;108(5):607-18. Review.
- Nath D, Shadan S. (2009) *The ubiquitin system*. Nature 458(7237):421.
- Neely GG, Hess A, Costigan M, Keene AC, Goulas S, Langeslag M, Griffin RS, Belfer I, Dai F, and Smith SB, et al. (2010) *A genome-wide Drosophila screen for heat nociception identifies a2d3 as an evolutionarily conserved pain gene*. Cell 143: 628–638.
- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, and Lawson SN (2001) *Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury*. Brain Res Mol Brain Res 95:1–8.
- Nieto-Rostro M, Sandhu G, Bauer CS, Jiruska P, Jefferys JG, Dolphin AC.( 2014) *Altered expression of the voltage-gated calcium channel subunit  $\alpha_2\delta$ -1: a comparison between two experimental models of epilepsy and a sensory nerve ligation model of neuropathic pain*. Neuroscience. 26;283:124-37.
- Nishida K, Kyoï S, Yamaguchi O, Sadoshima J, Otsu K. (2009) *The role of autophagy in the heart*. Cell Death Differ.;16(1):31-8. Review.
- Nowycky, M. C., A. P. Fox and R. W. Tsien (1985). *"Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity."* Nature **316**(6027): 440-443.

- Obermair GJ, Kugler G, Baumgartner S, Tuluc P, Grabner M, and Flucher BE (2005) *The Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta-1 subunit determines Ca<sup>2+</sup> current kinetics in skeletal muscle but not targeting of alpha1S or excitation-contraction coupling.* J Biol Chem 280:2229–2237.
- Ohsumi Y. (2001) *Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems.* Nat Rev Mol Cell Biol.;2(3):211-6. Review.
- Ohtsubo, K. and Marth, J. D. (2006). *Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease.* Cell **126**, 855-867
- Parent, L. and M. Gopalakrishnan (1995). *Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel.* Biophys J 69(5): 1801-1813.
- Parent, L., T. Schneider, C. P. Moore and D. Talwar (1997). *"Subunit regulation of the human brain alpha 1E calcium channel."* J Membr Biol **160**(2): 127-140.
- Park, K. H., Kwok, S. M., Sharon, C., Baerga, R., and Sesti, F. (2003). *N-Glycosylation-dependent block is a novel mechanism for drug-induced cardiac arrhythmia.* FASEB J. **17**, 2308-2309
- Pearse BR, Hebert DN. (2010) *Lectin chaperones help direct the maturation of glycoproteins in the endoplasmic reticulum.* Biochim Biophys Acta. 1803(6):684-93. Review.
- Pertusa, M., Madrid, R., Morenilla-Palao, C., Belmonte, C., and Viana, F. (2012). *N-Glycosylation of TRPM8 Ion Channels Modulates Temperature Sensitivity of Cold Thermoreceptor Neurons.* J. Biol. Chem. **287**, 18218-18229
- Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., and Yue, D. T. (1999). *Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type calcium channels.* Neuron **22**, 549-558
- Petrecca, K., Atanasiu, R., Akhavan, A., and Shrier, A. (1999). *N-linked glycosylation sites determine HERG channel surface membrane expression.* The Journal of Physiology **515**, 41-48
- Pirone A, Kurt S, Zuccotti A, Rüttiger L, Pilz P, Brown DH, Franz C, Schweizer M, Rust MB, and Rübsamen R, et al. (2014) *a2d3 is essential for normal structure and function of auditory nerve synapses and is a novel candidate for auditory processing disorders.* J Neurosci 34:434–445.

- Plant, L. D., Xiong, D., Dai, H., and Goldstein, S. A. N. (2014). *Individual IKs channels at the surface of mammalian cells contain two KCNE1 accessory subunits.* Proceedings of the National Academy of Sciences **111**, E1438-E1446
- Pragnell, M., M. De Waard, Y. Mori, T. Tanabe, T. P. Snutch and K. P. Campbell (1994). *"Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit."* Nature **368**(6466): 67-70.
- Qin N, Olcese R, Stefani E, and Birnbaumer L (1998) *Modulation of human neuronal alpha 1E-type calcium channel by alpha 2 d-subunit.* Am J Physiol **274**: C1324–C1331.
- Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW, Neefjes J (2004) *A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation.* Immunity **20**: 495–506, 2004
- Richard, S., Leclercq, F., Lemaire, S., Piot, C., and Nargeot, J. (1998). *Calcium currents in compensated hypertrophy and heart failure.* Cardiovasc Res **37**, 300-311
- Richard, S., Perrier, E., Fauconnier, J., Perrier, R., Pereira, L., Gomez, A. M., and Benitah, J. P. (2006). *Calcium-induced calcium entry or how the L-type Calcium channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells.* Progress. in Biophysics. and Molecular Biology **90**, 118-135
- Ringer, S. (1883a). *"A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart."* J Physiol **4**(1): 29-42 23.
- Ringer, S. (1883b). *"A third contribution regarding the Influence of the Inorganic Constituents of the Blood on the Ventricular Contraction."* J Physiol **4**(2-3): 222-225.
- Ríos E, Pizarro G. (1991) *Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle.* Physiol Rev. **71**(3):849-908. Review.
- Robinson, P., Etheridge, S., Song, L., Shah, R., Fitzgerald, E. M., and Jones, O. T. (2011). *Targeting of voltage-gated calcium channel alpha2delta-1 subunit to lipid rafts is independent from a GPI-anchoring motif.* PLoS One. **6**, e19802
- Rousset, M., T. Cens, S. Restituito, C. Barrere, J. L. Black, 3rd, M. W. McEnery and P. Charnet (2001). *"Functional roles of gamma2, gamma3 and gamma4, three new Ca<sup>2+</sup> channel subunits, in P/Q- type Ca<sup>2+</sup> channel expressed in Xenopus oocytes."* J Physiol **532**(Pt 3): 583-593.

- Rougier, J. S., Albesa, M., Syam, N., Halet, G., Abriel, H., and Viard, P. (2014). *Ubiquitin-specific protease USP2-45 acts as a molecular switch to promote alpha2delta1-induced downregulation of Cav1.2 channels.* Pflugers Arch - Eur J Physiol **1-11**
- Ruscic, K. J., Miceli, F., Villalba-Galea, C. A., Dai, H., Mishina, Y., Bezanilla, F., and Goldstein, S. A. N. (2013). *IKs channels open slowly because KCNE1 accessory subunits slow the movement of S4 voltage sensors in KCNQ1 pore-forming subunits.* Proceedings of the National Academy of Sciences **110**, E559-E566
- Sandoval, A., Oviedo, N., Andrade, A., and Felix, R. (2004). *Glycosylation of asparagines 136 and 184 is necessary for the alpha2delta subunit-mediated regulation of voltage-gated calcium channels.* FEBS Letters. **576**, 21-26
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) *Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci.* Nature **511**: 421–427.
- Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hordt, M., Towbin, J. A., Borggrefe, M., Assmann, G., Qu, X., Somberg, J. C., Breithardt, G., Oberti, C., and Funke, H. (1997). *KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome.* Nat. Genet. **17**, 267-268
- Scott, H. and Panin, V. M. (2014). *The role of protein N-glycosylation in neural transmission.* Glycobiology **24**, 407-417
- Seisenberger, C., V. Specht, A. Welling, J. Platzner, A. Pfeifer, S. Kuhbandner, J. Striessnig, N. Klugbauer, R. Feil and F. Hofmann (2000). *"Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse."* J Biol Chem **275**(50): 39193-39199.
- Shakeri, B., Bourdin, B., Demers-Giroux, P. O., Sauve, R., and Parent, L. (2012). *A quartet of Leucine residues in the Guanylate Kinase domain of Cavbeta determines the plasma membrane density of the Cav2.3 channel.* J Biol Chem **287**, 32835-32847
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Dascal, N. (1991). *The roles of the subunits in the function of the calcium channel.* Science. **253**, 1553-1557
- Splawski, I., K. W. Timothy, L. M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P. J. Schwartz, R. M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S. G. Priori, M. C. Sanguinetti and M. T. Keating (2004). *"Ca(V)1.2 calcium*

*channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism." Cell **119**(1): 19-31.*

Splawski, I., K. W. Timothy, N. Decher, P. Kumar, F. B. Sachse, A. H. Beggs, M. C. Sanguinetti and M. T. Keating (2005). "Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(23): 8089-8096; discussion 8086-8088.

Song, L., spinoza-Fuenzalida IA - Etheridge, S., Jones, O., and Fitzgerald, E. M. (2015). *The R-domain: Identification of an N-terminal region of the alpha2delta-1 subunit which is necessary and sufficient for its effects on Cav2.2 calcium currents.* Curr Mol Pharmacol **in press**,

Stanley, E. F. (1997). "The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face." Trends Neurosci **20**(9): 404- 409.

Stanley, P., Schachter, H., and Taniguchi, N. (2009). N-Glycans. *In Essentials of Glycobiology*, Second Edition, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 101–114.

Stockner T and Koschak A (2013) *What can naturally occurring mutations tell us about Ca(v)1.x channel function?* Biochim Biophys Acta 1828:1598–1607.

Striessnig, J., K. Moosburger, A. Goll, D. R. Ferry and H. Glossmann (1986). Stereoselective photoaffinity labelling of the purified 1,4- dihydropyridine receptor of the voltage-dependent calcium channel. Eur J Biochem **161**(3): 603-609.

Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G, Tuluc P.(2014) *L-type Ca(2+) channels in heart and brain.* Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal. **1**;3(2):15-38.

Sun LS, Quamina A. (2004) *Extracellular receptor kinase and cAMP response element binding protein activation in the neonatal rat heart after perinatal cocaine exposure.* Pediatr Res. 2004 **56**(6):947-52.

Suzuki, S., Shuto, T., Sato, T., Kaneko, M., Takada, T., Suico, M. A., Cyr, D. M., Suzuki, H., and Kai, H. (2014). *Inhibition of post-translational N-glycosylation by HRD1 that controls the fate of ABCG5/8 transporter.* Scientific Reports. **4**, 4258

Swartz, K. J. (2004). *Towards a structural view of gating in potassium channels.* Nat Rev Neurosci **5**(12): 905-916.

- Templin, C., Ghadri, J. R., Rougier, J. S., Baumer, A., Kaplan, V., Albesa, M., Sticht, H., Rauch, A., Puleo, C., Hu, D., Barajas-Martinez, H., Antzelevitch, C., Luscher, T. F., Abriel, H., and Duru, F. (2011). *Identification of a novel loss-of-function calcium channel gene mutation in short QT syndrome (SQTS6)*. Eur. Heart J **32**, 1077-1088
- Trepanier-Boulay, V., Lupien, M. A., St-Michel, C., and Fiset, C. (2004). *Postnatal development of atrial repolarization in the mouse*. Cardiovasc Res **64**, 84-93
- Triggle, D. J. (1999). *"The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels."* Eur J Pharmacol **375**(1- 3): 311-325.
- Tuluc P, Kern G, Obermair GJ, and Flucher BE (2007) *Computer modeling of siRNA knockdown effects indicates an essential role of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta-1 subunit in cardiac excitation-contraction coupling*. Proc Natl Acad Sci USA **104**: 11091–11096.
- Vacher, H. and Trimmer, J. S. (2012). *Trafficking Mechanisms Underlying Neuronal Voltage-gated Ion Channel Localization at the Axon Initial Segment*. Epilepsia **53**, 21-31
- Van Petegem, F., K. A. Clark, F. C. Chatelain and D. L. Minor, Jr. (2004). *Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta- subunit and an alpha-subunit domain*. Nature **429**(6992): 671-675.
- Van Petegem, F., F. C. Chatelain and D. L. Minor, Jr. (2005). *"Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex."* Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1108-1115.
- Van Petegem F, Duderstadt KE, Clark KA, Wang M, Minor DL Jr. (2008) *Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaValpha1 AID-CaVbetainteraction site that is critical for channel modulation*. Structure ;**16**(2):280-94
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., Lamorgese, M., Rossie, S. S., McCarthy, P. M., and Nerbonne, J. M. (1999). *Atrial L-Type Calcium Currents and Human Atrial Fibrillation*. Circ Res **85**, 428-436
- Wakamori M, Mikala G, and Mori Y (1999) *Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type Ca<sup>2+</sup> channel current in Xenopus oocytes*. J Physiol **517**:659–672.
- Walsh C. (2006) *Posttranslational modification of proteins : Expanding nature's inventory*. Englewood, Colo.: Roberts and Co. Publishers. xxi, 490 p. p.



- Walsh, C. P., Davies, A., Butcher, A. J., Dolphin, A. C., and Kitmitto, A. (2009). *Three-dimensional Structure of CaV3.1*. J. Biol. Chem. **284**, 22310-22321
- Walker, D., D. Bichet, K. P. Campbell and M. De Waard (1998). "A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1A subunit." J Biol Chem **273**(4): 2361-2367.
- Walker, D. and M. De Waard (1998). *Subunit interaction sites in voltage- dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function*. Trends Neurosci 21(4): 148-154.
- Wall-Lacelle, S., Hossain, M. I., Sauve, R., Blunck, R., and Parent, L. (2011). *Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in IIS4-S5 linker for the activation of the Cav2.3 calcium channel*. J Biol Chem. **286**, 27197-27205
- Wang, M. et al. (1999) *Structural requirement of the calcium-channel subunit  $\alpha_2\delta$  for gabapentin binding*. Biochem. J. 342, 313–320
- Watanabe, I., Wang, H. G., Sutachan, J. J., Zhu, J., Recio-Pinto, E., and Thornhill, W. B. (2003). *Glycosylation affects rat Kv1.1 potassium channel gating by a combined surface potential and cooperative subunit interaction mechanism*. J. Physiol. **550**, 51-66
- Welty DF, Schielke GP, Vartanian MG, and Taylor CP (1993) *Gabapentin anticonvulsant action in rats: disequilibrium with peak drug concentrations in plasma and brain microdialysate*. Epilepsy Res **16**:175–181.
- Wemhöner K, Friedrich C, Stallmeyer B, Coffey AJ, Grace A, Zumhagen S, Seeböhm G, Ortiz-Bonnin B, Rinné S, and Sachse FB, et al. (2015) *Gain-of-function mutations in the calcium channel CACNA1C (Cav1.2) cause non-syndromic long-QT but not Timothy syndrome*. J Mol Cell Cardiol 80:186–195.
- Weng, T. Y., Chiu, W. T., Liu, H. S., Cheng, H. C., Shen, M. R., Mount, D. B., and Chou, C. Y. (2013). *Glycosylation regulates the function and membrane localization of KCC4*. Biochimica. et Biophysica. Acta (BBA. ) - Molecular Cell Research **1833**, 1133-1146
- Wheeler, D. B., A. Randall and R. W. Tsien (1994). "Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission." Science **264**(5155): 107-111.
- White IJ, Souabni A, Hooper NM. (2000) *Comparison of the glycosyl-phosphatidylinositol cleavage/attachment site between mammalian cells and parasitic protozoa*. J Cell Sci.;113 ( Pt 4):721-7.
- Whittaker, C.A. and Hynes, R.O. (2002) *Distribution and evolution of von*

*Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere.* Mol. Biol. Cell 13, 3369– 3387

Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (1992). *Structure and functional expression of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype.* Neuron 8, 71-84

Winchester, B. (2005). *Lysosomal metabolism of glycoproteins.* Glycobiology 15, 1R-15R

Worley PF, Zeng W, Huang G, Kim JY, Shin DM, Kim MS, Yuan JP, Kiselyov K, Muallem S. (2007) *Homer proteins in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling by excitable and non-excitable cells.* Cell Calcium. 42(4-5):363-71. Review

Wormald, M. R. and Dwek, R. A. (1999). *Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability.* Structure 7, R155-R160

Wu F, Mi W, Hernández-Ochoa EO, Burns DK, Fu Y, Gray HF, Struyk AF, Schneider MF, and Cannon SC (2012) *A calcium channel mutant mouse model of hypokalemic periodic paralysis.* J Clin Invest 122:4580–4591.

Wycisk KA, Budde B, Feil S, Skosyrski S, Buzzi F, Neidhardt J, Glaus E, Nürnberg P, Ruether K, and Berger W (2006a) *Structural and functional abnormalities of retinal ribbon synapses due to Cacna2d4 mutation.* Invest Ophthalmol Vis Sci 47:3523–3530.

Wycisk KA, Zeitz C, Feil S, Wittmer M, Forster U, Neidhardt J, Wissinger B, Zrenner E, Wilke R, and Kohl S, et al. (2006b) *Mutation in the auxiliary calcium-channel subunit CACNA2D4 causes autosomal recessive cone dystrophy.* Am J Hum Genet 79:973–977.

Xu W, Lipscombe D. (2001) *Neuronal  $\text{Ca(V)}1.3\alpha(1)$  L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines.* J Neurosci. 25;21(16):5944-51.

Yarotskyy V and Dirksen RT (2013) *Cav1.1 in malignant hyperthermia, in Pathologies of Calcium Channels* (Weiss N and Koschak A, eds) pp 151–165, Springer Science & Business Media, Berlin.

Yasuda T, Chen L, Barr W, McRory JE, Lewis RJ, Adams DJ, and Zamponi GW (2004) *Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells.* Eur J Neurosci 20:1–13.

Yifrach, O. and MacKinnon, R. (2002). *Energetics of pore opening in a voltage-gated  $\text{K}(+)$  channel.* Cell. 111, 231-239

- Yoshii, M., A. Tsunoo and T. Narahashi (1988). *"Gating and permeation properties of two types of calcium channels in neuroblastoma cells."* Biophys J **54**(5): 885-895.
- Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z., and Nattel, S. (1997). *Ionic Remodeling Underlying Action Potential Changes in a Canine Model of Atrial Fibrillation.* Circ Res **81**, 512-525
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. (2015) *The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential.* Pharmacol Rev. 67(4):821-70. Review.
- Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J., and Taniguchi, N. (2008). *Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins.* FEBS Journal **275**, 1939-1948
- Zhang, Z., Y. He, D. Tuteja, D. Xu, V. Timofeyev, Q. Zhang, K. A. Glatzer, Y. Xu, H. S. Shin, R. Low and N. Chiamvimonvat (2005). *"Functional roles of Cav1.3(alpha1D) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice."* Circulation **112**(13): 1936- 1944.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, K. Deisseroth, R. W. Tsien and H. Reuter (1999). *"Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels."* Nature **399**(6732): 159-162.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, R. W. Tsien and H. Reuter (2000). *"Ca<sup>2+</sup>- sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin- binding motif in the(alpha)1C subunit."* J Biol Chem **275**(28): 21121- 21129.

## 7 APPENDICES

### 7.1 Alignement des séquences de Ca<sub>v</sub>α2δ1 et conservation des sites de glycosylation de type N

16xN :92, 184, 324, 348, 468, 475, 585, 594, 663, 769, 812, 876, 883, 973, 986

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| HS    | MAAGCLLALTTLTLFQSLIGPSSEEPFPSAVTIKSWVDKMQEDLVTLAKTASGVNQLVDI  | 60  |
| MM    | MAAGCLLALTTLTLFQSLIGPSSEEPFPSVTIKSWVDKMQEDLVTLAKTASGVTQLADI   | 60  |
| RN    | MAAGCLLALTTLTLFQSWLIGPSSEEPFPSVTIKSWVDKMQEDLVTLAKTASGVTQLADI  | 60  |
| ***** |   |     |
| HS    | YEKYQDLYTVEPNNAQLVEIAARDIEKLLSNRSKALVRLALEAEKVQAAHQWREDFASN   | 120 |
| MM    | YEKYQDLYTVEPNNAQLVEIAARDIEKLLSNRSKALVRLAMEAEKVQAAHQWREDFASN   | 120 |
| RN    | YEKYQDLYTVEPNNAQLVEIAARDIEKLLSNRSKALVRLAMEAEKVQAAHQWREDFASN   | 120 |
| ***** |   |     |
| HM    | EVVYYNAKDDLDPEKNDSEPGSQRIKPVFIEDANFGRQISYQHAAVHIPTDIYEGSTIVL  | 180 |
| MM    | EVVYYNAKDDLDPERNESEPGSQRIKPVFIEDANFGRQISYQHAAVHIPTDIYEGSTIVL  | 180 |
| RN    | EVVYYNAKDDLDPERNESESGSQRIKPVFIEDANFGRQISYQHAAVHIPTDIYEGSTIVL  | 180 |
| ***** |   |     |
| HS    | NELNWTSSALDEVFKKNREEDPSLLWQVFGSATGLARYYPASPWVDNSRTPNKIDLYDVRR | 240 |
| MM    | NELNWTSSALDEVFKNRDEDPTLLWQVFGSATGLARYYPASPWVDNSRTPNKIDLYDVRR  | 240 |
| RN    | NELNWTSSALDEVFKNRDEDPTLLWQVFGSATGLARYYPASPWVDNSRTPNKIDLYDVRR  | 240 |
| ***** |   |     |
| HM    | RPWYIQGAASPKDMLILVDVSGSVSGLTLKLIRTSVSEMLETSDDDFVNVASFNSNAQD   | 300 |
| MM    | RPWYIQGAASPKDMLILVDVSGSVSGLTLKLIRTSVSEMLETSDDDFVNVASFNSNAQD   | 300 |
| RN    | RPWYIQGAASPKDMLILVDVSGSVSGLTLKLIRTSVSEMLETSDDDFVNVASFNSNAQD   | 300 |

```

*****

HS      VSCFQHLVQANVRNKKVLKDAVNNITAKGITDYKKGFSFAFEQLLNYNVSRANCNKIIML      360
MM      VSCFQHLVQANVRNKKVLKDAVNNITAKGITDYKKGFSFAFEQLLNYNVSRANCNKIIML      360
RN      VSCFQHLVQANVRNKKVLKDAVNNITAKGITDYKKGFSFAFEQLLNYNVSRANCNKIIML      360

*****

HS      FTDGGEERAQEIFNKYNKDKKVRVFTFSVGQHNYDRGPIQWMACENKGYYYEIPSIGAIR      420
MM      FTDGGEERAQEIFAKYNKDKKVRVFTFSVGQHNYDRGPIQWMACENKGYYYEIPSIGAIR      420
RN      FTDGGEERAQEIFAKYNKDKKVRVFTFSVGQHNYDRGPIQWMACENKGYYYEIPSIGAIR      420

*****

HS      INTQEYLDVLGRPMVLGDKAKQVQWTNVYLDALGLVITGTLPVFNITGQFENKTNLK      480
MM      INTQEYLDVLGRPMVLGDKAKQVQWTNVYLDALGLVITGTLPVFNVTGQSENKTNLK      480
RN      INTQEYLDVLGRPMVLGDKAKQVQWTNVYLDALGLVITGTLPVFNVTGQSENKTNLK      480

*****:***

HS      NQLILGVMGVDVSLEDIKRLTPRFTLCPNGYYFAIDPNGYVLLHPNLQPK-----      530
MM      NQLILGVMGVDVSLEDIKRLTPRFTLCPNGYYFAIDPNGYVLLHPNLQPKPIGVGIPTIN      540
RN      NQLILGVMGVDVSLEDIKRLTPRFTLCPNGYYFAIDPNGYVLLHPNLQPK-----      530

*****

HS      -----NPKSQEPVTLDFLDAELENDIKVEIRNKMIDGESGEKTFRTL VKSQDERYI      581
MM      LRKRRPNVQNPKSQEPVTLDFLDAELENEIKVEIRNKMIDGESGEKTFRTL VKSQDERYI      600
RN      -----NPKSQEPVTLDFLDAELENDIKVEIRNKMIDGESGEKTFRTL VKSQDERYI      581

*****:*****

HS      DKGNRTYTWTPVNGTDYSLALVLP TYSFYIYKAKLEETITQARSKKGKMKDSETLKPDNF      641
MM      DKGNRTYTWTPVNGTDYSLALVLP TYSFYIYKAKLEETITQARY-----SETLKPDNF      653
RN      DKGNRTYTWTPVNGTDYSLALVLP TYSFYIYKAKIEETITQARSKKGKMKDSETLKPDNF      641

```

\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

|                               |  |      |
|-------------------------------|--|------|
| HS                            | EESGYTFIAPRDYCNDLKISD <b>NNTE</b> FLLNFNEFIDRKTTPNNPSCNADLINRVLLDAGFTN         | 701  |
| MM                            | EESGYTFIAPREYCNDLKPSD <b>NNTE</b> FLLNFNEFIDRKTTPNNPSCNTDLINRILLDAGFTN         | 713  |
| RN                            | EESGYTFIAPREYCNDLKPSD <b>NNTE</b> FLLNFNEFIDRKTTPNNPSCNTDLINRILLDAGFTN         | 701  |
| *****:***** *****:*****:***** |  |      |
| HS                            | ELVQNYWSKQKNIKGVKARFVVDGGITRVYPKEAGENWQENPETYEDSFYKRSLDNDNY                    | 761  |
| MM                            | ELVQNYWSKQKNIKGVKARFVVDGGITRVYPKEAGENWQENPETYEDSFYKRSLDNDNY                    | 773  |
| RN                            | ELVQNYWSKQKNIKGVKARFVVDGGITRVYPKEAGENWQENPETYEDSFYKRSLDNDNY                    | 761  |
| *****                         |  |      |
| HS                            | VFTAPYF <b>NKSG</b> PGAYESGIMVSKAVEIYIQGKLLKPAVVGKIDVNSWIE <b>NFTK</b> TSIRDP  | 821  |
| MM                            | VFTAPYF <b>NKSG</b> PGAYESGIMVSKAVELYIQGKLLKPAVVGKIDVNSWIE <b>NFTK</b> TSIRDP  | 833  |
| RN                            | VFTAPYF <b>NKSG</b> PGAYESGIMVSKAVELYIQGKLLKPAVVGKIDVNSWIE <b>NFTK</b> TSIRDP  | 821  |
| *****:*****                   |  |      |
| HS                            | CAGPVCDCKRNSDVMDCVILDDGGFLLMANHDDYTQIGRFFGEIDPSLMRHLV <b>NISV</b> YA           | 881  |
| MM                            | CAGPVCDCKRNSDVMDCVILDDGGFLLMANHDDYTQIGRFFGEIDPSMMRHLV <b>NISL</b> YA           | 893  |
| RN                            | CAGPVCDCKRNSDVMDCVILDDGGFLLMANHDDYTQIGRFFGEIDPSMMRHLV <b>NISL</b> YA           | 881  |
| *****:*****:*                 |  |      |
| HS                            | F <b>NKSY</b> DYQSVCEPGAAPKQGAGHRSAVPSVADILQIGWWATAAAWSILQQFLLSLTFPR           | 941  |
| MM                            | F <b>NKSY</b> DYQSVCDPGAAPKQGAGHRSAVPSIADILQIGWWATAAAWSILQQLLSLTFPR            | 953  |
| RN                            | F <b>NKSY</b> DYQSVCDPGAAPKQGAGHRSAVPSITDILQIGWWATAAAWSILQQLLSLTFPR            | 941  |
| *****:*****:*****:*****       |  |      |
| HS                            | LLEAVEMEDDDFTASLSKQSCITEQTQYFFD <b>NDISK</b> SFSGVLDCG <b>NCSR</b> IFHGKLMNTNL | 1001 |
| MM                            | LLEAVEMEEDDFTASLSKQSCITEQTQYFFK <b>NDTK</b> SFSGLLDCG <b>NCSR</b> IFHVEKLMNTNL | 1013 |
| RN                            | LLEAVEMEEDDFTASLSKQSCITEQTQYFFK <b>NDTK</b> SFSGLLDCG <b>NCSR</b> IFHVEKLMNTNL | 1001 |
| *****:*****:*****:***** ***** |  |      |

|    |  |      |
|----|--|------|
| HS | IFIMVESKGTCPDTRLLIQAEQTS DGPNPCDMVKQPRYRKGPDVCFDNNVLEDYTD CGG  | 1061 |
| MM | VFIMVESKGTCPDTRLLMQAEQTS DGPDPDCDMVKQPRYRKGPDVCFDNNVLEDYTD CGG | 1073 |
| RN | VFIMVESKGTCPDTRLLMQAEQTS DGPDPDCDMVKQPRYRKGPDVCFDNNVLEDYTD CGG | 1061 |
|    | :*****:*****:*****   |      |
|    |  |      |
| HS | VSGLNPSLWYIIGIQFLLLWLVSGSTH RLL                                | 1091 |
| MM | VSGLNPSLWSIFGLQFILLWLVSGSRH YLL                                | 1103 |
| RN | VSGLNPSLWSIFGLQFILLWLVSGSRH YLW                                | 1091 |
|    | ***** *:*:***** *  |      |

## 7.2 Article : Identification of Glycosylation Sites Essential for Surface Expression of the Ca<sub>v</sub> α2δ1 Subunit and Modulation of the Cardiac Ca<sub>v</sub>1.2 Channel Activity



# Identification of Glycosylation Sites Essential for Surface Expression of the $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ Subunit and Modulation of the Cardiac $\text{Ca}_v 1.2$ Channel Activity\*

Received for publication, September 13, 2015, and in revised form, January 6, 2016. Published, JBC Papers in Press, January 7, 2016, DOI 10.1074/jbc.M115.692178

Marie-Philippe Tétreault<sup>†1</sup>, Benoîte Bourdin<sup>†1</sup>, Julie Briot<sup>‡</sup>, Emilie Segura<sup>‡</sup>, Sylvie Lesage<sup>§</sup>, Céline Fiset<sup>¶</sup>, and Lucie Parent<sup>‡2</sup>

From the <sup>†</sup>Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Faculté de Médecine, and <sup>¶</sup>Faculté de Pharmacie, Institut de Cardiologie de Montréal and <sup>§</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie, and Immunologie, Faculté de Médecine, Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal

Alteration in the L-type current density is one aspect of the electrical remodeling observed in patients suffering from cardiac arrhythmias. Changes in channel function could result from variations in the protein biogenesis, stability, post-translational modification, and/or trafficking in any of the regulatory subunits forming cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel complexes.  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is potentially the most heavily N-glycosylated subunit in the cardiac L-type  $\text{Ca}_v 1.2$  channel complex. Here, we show that enzymatic removal of N-glycans produced a 50-kDa shift in the mobility of cardiac and recombinant  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins. This change was also observed upon simultaneous mutation of the 16 Asn sites. Nonetheless, the mutation of only 6/16 sites was sufficient to significantly 1) reduce the steady-state cell surface fluorescence of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  as characterized by two-color flow cytometry assays and confocal imaging; 2) decrease protein stability estimated from cycloheximide chase assays; and 3) prevent the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -mediated increase in the peak current density and voltage-dependent gating of  $\text{Ca}_v 1.2$ . Reversing the N348Q and N812Q mutations in the non-operational sextuplet Asn mutant protein partially restored  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  function. Single mutation N663Q and double mutations N348Q/N468Q, N348Q/N812Q, and N468Q/N812Q decreased protein stability/synthesis and nearly abolished steady-state cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  as well as the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -induced up-regulation of L-type currents. These results demonstrate that Asn-663 and to a lesser extent Asn-348, Asn-468, and Asn-812 contribute to protein stability/synthesis of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , and furthermore that N-glycosylation of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is essential to produce functional L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

(high nanomolar range) by the concerted action of mechanisms that prevent  $\text{Ca}^{2+}$  entry, promote its extrusion (mostly via the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger), and ensure its storage in the sarcoplasmic reticulum (2).  $\text{Ca}^{2+}$  entry is mediated mainly by the cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel, which is central to the initiation of excitation-contraction coupling via  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum. Regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current has profound physiological significance. Indeed, alterations in density or the activation/inactivation gating of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels have been implicated in a variety of cardiovascular diseases (3, 4), including cardiac arrhythmias such as atrial fibrillation (5–8), heart failure (9, 10), and ischemic heart disease (10). The molecular mechanisms underlying changes in the activity of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel remain under study for most pathologies.

The L-type  $\text{Ca}_v 1.2$  channel belongs to the molecular family of high voltage-activated  $\text{Ca}_v$  channels. High voltage-activated  $\text{Ca}_v 1.2$  channels are hetero-oligomers composed of the main pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha 1$  subunit non-covalently bound to the cytoplasmic  $\text{Ca}_v\beta$  auxiliary subunit, the EF-hand protein calmodulin (constitutively bound to the C terminus of  $\text{Ca}_v\alpha 1$ ), and the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  subunit (11–16). The full complement of auxiliary subunits is required to produce high voltage-activated  $\text{Ca}_v 1.2$  channels with the properties of the native channels.  $\text{Ca}_v\beta$  promotes the cell surface density of  $\text{Ca}_v 1.2$  channels through a high affinity interaction (17) in part by preventing its degradation by the ubiquitin/proteasome system (18). Co-expression of the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  subunit with  $\text{Ca}_v\beta$ -bound  $\text{Ca}_v\alpha 1$  increases peak current density and promotes channel activation at more negative voltages (19–23). Although the molecular mechanism underlying this effect remains to be fully elucidated, the cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  dictates the net  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (22). The  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  subunit, encoded by *CACNA2D1*, is expressed in skeletal muscle (24) and in cardiac muscle (25) where it is the main isoform associated with  $\text{Ca}_v 1.2$  (25, 26). The  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  proteins undergo complex co- and post-translational modifications. Endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2$  and  $\text{Ca}_v\delta$  are usually thought to be produced as a single protein that is proteolytically cleaved and then linked through strong disulfide bonds (27, 28). Although  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  has been traditionally described as a type I transmembrane protein, it has been recently shown that  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  proteins associate with the plasma membrane through a glycosylphosphatidylinositol

The regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in cardiac cells is critical to the generation of the force necessary for the myocardium to meet the physiological needs of the body (1). In resting cells, intracellular free ionized  $\text{Ca}^{2+}$  is maintained at a low concentration

\* This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Operating Grant 130256 and a grant-in-aid from the Heart and Stroke Foundation of Canada (to L.P.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.



## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

anchor attached to  $\text{Ca}_v\delta$  (29), although the functional relevance of this process remains to be fully established (30).  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  subunits are also heavily glycosylated. It is estimated that N-glycans contribute as much as  $\approx 30\text{--}50$  kDa to the molecular mass of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  (26, 27, 31, 32) making it a unique target for endoplasmic reticulum (ER)<sup>3</sup> glycoprotein quality control (33–36).

Glycosylation is a form of co- and post-translational covalent modification that serves a variety of structural and functional roles in membrane and secreted proteins. The major classes of glycans being produced in eukaryotic cells are as follows: 1) Asn (N)-linked glycans attached to the nitrogen atom of asparagine side chains; 2) O-linked glycans attached to the hydroxyl oxygen of serine, threonine, tyrosine, hydroxylysine, or hydroxyproline side chains; and 3) C-linked glycans, a rare form of glycosylation, attached to a carbon on a tryptophan side chain. N-Glycosylation, one of the most abundant types of protein glycosylation (37), is initiated by the co-translational addition by the oligosaccharyltransferase of glucose<sub>3</sub>-mannose<sub>9</sub>-N-acetylglucosamine<sub>2</sub> core oligosaccharides to the Asn residue of the lumenally exposed consensus glycosylation site Asn-Xaa-(Ser/Thr) (NX(S/T)) where Xaa is any amino acid except proline (Pro), serine (Ser), and threonine (Thr) (38). The transfer of N-glycans to Asn-Xaa-(Ser/Thr) sites occurs on the luminal side of the ER membrane while the protein moiety is being synthesized on ER-bound ribosomes; hence, only domains that are accessible to the ER lumen will receive N-glycans. Membrane glycoproteins remain anchored in the ER membrane with portion(s) either exposed to the ER lumen, embedded in the membrane, or within the cytoplasm. Subsequent trimming of glucose and mannose residues determines whether the polypeptide undergoes additional folding cycles or is targeted for the ER-associated degradation (ERAD) by retrotranslocation and ubiquitin proteasome-dependent proteolysis in the cytosol. This process is critical for protein biosynthesis, and abrogation of glycosylation causes embryonic lethality in mice (39).

Defective glycosylation of cardiac ion channels plays a role in multiple cardiac pathologies (40–44). In this work, we have characterized the role of N-glycosylation on cell surface density and the function of the  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  auxiliary subunit using mobility shift assays, cycloheximide pulse-chase analysis, confocal imaging, flow cytometry assays, and patch clamp recordings of recombinant  $\text{Ca}_v1.2$  currents. Here, we showed that a single mutation at Asn-663 prevented the cell surface presentation and the function of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ , although the protein remains strongly glycosylated. Mutations of other sites proved to alter channel function to a lesser extent. Simultaneous mutation of 6/16 consensus N-glycosylation sites in the extracellular portion of the  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  protein curtailed protein stability and impaired channel function with a predominant role for Asn-348 and Asn-812. Furthermore, combining the N468Q mutation with N348Q and/or N812Q disturbed L-type channel function. Single mutations of the other Asn sites (out of the 16 tested) were without significant func-

tional impact. Altogether, our data support a model where four Asn residues are essential to form functional L-type  $\text{Ca}_v1.2$  currents.

### Experimental Procedures

**Recombinant DNA Techniques**—The rabbit  $\text{Ca}_v1.2$  (GenBank<sup>TM</sup> accession number X15539) and the rat  $\text{Ca}_v\beta3$  (GenBank<sup>TM</sup> accession number M88751) (45) were subcloned in commercial vectors under the control of the CMV promoter as described elsewhere (22, 46). The primary sequence (1091 residues) of the rat brain  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  clone (GenBank<sup>TM</sup> accession number NM\_012919) (47) was subcloned in three vectors. Most experiments were performed with pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA, where  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  was subcloned in the pmCherry-N1 vector (Cederlane, Burlington, Ontario, Canada) between the SacI and Sall sites, and the hemagglutinin (HA) epitope (YPYDVPDYA) was inserted in the extracellular domain of  $\text{Ca}_v\alpha2$  between Asp-676 and Arg-677 (22).  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  was also subcloned in homemade vectors derived from the pCMV-Script vector and are referred to as pCMV- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  and pC2- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  in Fig. 2B. Except for Fig. 2B, the pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA construct was used throughout.

**Site-directed Mutagenesis**—Single pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA mutants were produced with the Q5 site-directed mutagenesis kit (New England Biolabs Inc., Whitby, Ontario, Canada) as described elsewhere (22). Multiple glycosylation mutations were introduced simultaneously in the pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA construct using Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. Briefly, multiple overlapping primers were designed to incorporate mutations in  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . Fragments containing the mutations were PCR-amplified, purified from agarose gel using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), and assembled with the 2 $\times$  Gibson Assembly Master Mix before transformation into high efficiency DH5- $\alpha$  competent *Escherichia coli*. Constructs were verified by automated double-stranded sequence analysis (Genomics Platform, IRIC, Université de Montréal, Québec, Canada). In this work, multiple mutations are referred to as "yxNQ" where "y" denotes the number of Asn (N) to Gln (Q) or NQ mutations introduced in the constructs. Accordingly the multiple mutations used include: 4xNQ, N92Q/N348Q/N594Q/N876Q; 5xNQ, N92Q/N184Q/N468Q/N876Q/N986Q; 6xNQ, N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q; 7xNQ, N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q/N986Q; 13xNQ, N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/N468Q/N585Q/N594Q/N769Q/N812Q/N876Q/N883Q/N986Q/N1066Q; 14xNQ, N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/N468Q/N585Q/N594Q/N663Q/N769Q/N812Q/N876Q/N883Q/N986Q/N1066Q; and 16xNQ, N92Q/N136Q/N184Q/N324Q/N348Q/N468Q/N475Q/N585Q/N594Q/N663Q/N769Q/N812Q/N876Q/N883Q/N973Q/N986Q. Protein expression of these constructs was confirmed by Western blotting in total cell lysates as described previously (17, 22).

**Cell Culture and Transfections**—HEK293T or HEKT (human embryonic kidney 293 cells stably expressing an SV40 temperature-sensitive T antigen) and HEKT cells stably transfected with  $\text{Ca}_v\beta3$  were grown in Dulbecco's high glucose minimum essential medium (DMEM-HG) supplemented with 10% fetal

<sup>3</sup> The abbreviations used are: ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; PNGase F, peptide-N-glycosidase F; WGA, wheat germ agglutinin; pF, picofarad.

## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

bovine serum, 1% penicillin/streptomycin at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere as described elsewhere (17, 22). HEKT cells were transfected at 80–90% confluence (1 million cells per 35-mm culture dish) with similar amounts of DNA (1:1 ratio or 4:4 µg) for pCMV-Ca<sub>v</sub>1.2 WT and pCMV-based Ca<sub>v</sub>α2δ1 constructs in 10 µl of Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Inc.) using a DNA/lipid ratio of 1:2.5 (17, 22). The pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA construct was either expressed as pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or as pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA NQ mutants. Mock transfection was achieved with the empty vector referred to as pmCherry-no insert. A total of 8 µg of DNA was thus transfected per 10<sup>6</sup> HEKT-stable Ca<sub>v</sub>β3 cells in all experiments.

**Culture and Imaging of Mouse Cardiomyocytes**—Experiments were approved by the Animal Protection Committee of the Montreal Heart Institute (protocol 2014-44-01) and were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th Edition (2011). Ventricular myocytes were isolated from neonate (22, 48, 49) or adult (50) CD-1 mice as described elsewhere. In the latter case, CD-1 male mice (5 months old) (Charles River Laboratories, St. Constant, Canada) were anesthetized with isoflurane. Hearts were quickly removed and placed on ice-cold Tyrode's solution containing 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 5.5 mM glucose, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4. Ventricles were isolated and homogenized at 4 °C in a Tris-based solution containing a mix of protease inhibitors (Sigma), including 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, aprotinin, bestatin, E-64, leupeptin, and 1 mM EDTA, pH 7.4 (50). Cells were fixed (2% paraformaldehyde, pH 7.4, 15 min, 4 °C), blocked, and permeabilized (2% normal donkey serum, 0.1% Triton X-100, 60 min, at room temperature). Three washes with phosphate-buffered saline (PBS) followed each step. After overnight incubation at 4 °C with primary anti-Ca<sub>v</sub>α2δ1 antibody (1:50) (Santa Cruz Biotechnology) in 1% donkey serum with 0.05% Triton X-100, cells were incubated with the secondary Alexa 488 antibody (Life Technologies, Inc.) (1:800) for 90 min at room temperature. Cells were stained with DAPI (1:1000) (Life Technologies, Inc.) for 10 min to identify the nucleus and with the wheat germ agglutinin-647 (WGA-647) (1:200) (Life Technologies, Inc.) to visualize cell membrane glycoproteins (51, 52). WGA is a carbohydrate-binding protein of approximately 36 kDa that selectively recognizes sialic acid and N-acetylglucosaminyl sugar residues. Confocal fluorescent images were captured with a Zeiss LSM 710 confocal microscope system with a ×63/1.40 oil objective. The images were analyzed using FIJI software to delete background, subtract noise, and to produce co-localization pixel maps.

**Live Imaging of HEKT Cells**—HEKT cells stably transfected with Ca<sub>v</sub>β3 were transiently transfected simultaneously with pCMV-Ca<sub>v</sub>1.2 and pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or NQ mutants. Cells were dissociated and seeded 6 h after transfection to obtain isolated cells for imaging. Exactly 24 h after transfection, cells were stained with the fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse monoclonal anti-HA. Nuclei were stained with DAPI (1:1000) (Life Technologies, Inc.) in 1× PBS for 45 min at 4 °C. Confocal fluorescent images were captured with

the same Zeiss LSM 710 confocal microscope used for cardiomyocyte imaging (see above).

**Glycosidase Assays**—Isolated mouse cardiomyocytes or transfected HEKT cells were solubilized in a radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mM Tris, pH 8.0) (Sigma) supplemented with a protease inhibitor mixture (Sigma). Cell lysates (20 µg of proteins) were first incubated under denaturing conditions (0.5% SDS and 40 mM DTT) and then treated with 500 units of peptide-N-glycosidase F (PNGase F, New England Biolab) during 1 h at 37 °C according to the manufacturer's instructions. Proteins were added to the Laemmli sample buffer in the presence of 0.4 mM 2-mercaptoethanol and electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide gel alongside the Precision Plus Protein™ dual color standard (Bio-Rad). After electroblotting and blocking with 5% (w/v) skim milk for 30 min, the supported nitrocellulose membranes (Bio-Rad) were incubated with the anti-Ca<sub>v</sub>α2δ (1:750, Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Membranes were stripped and incubated with an anti-GAPDH as a loading control (1:10,000, Sigma) unless stated otherwise. Signal was detected with the Bio-Rad ECL chemiluminescent substrate. Blots were visualized with the ChemiDoc Touch documentation system (Bio-Rad). Molecular weights were estimated using Image Lab™ software by linear regression of standard molecular weight markers. The molecular mass of the Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein in cardiomyocytes was calculated at 123 kDa. The calculated molecular mass of the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA construct is 153 kDa. GAPDH migrated as a monomer close to 37 kDa in accordance with its calculated mass.

**Cycloheximide Chase Assays**—Stably transfected Ca<sub>v</sub>β3 cells were transiently transfected simultaneously with pCMV-Ca<sub>v</sub>1.2 WT and pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or NQ mutants. Cells were incubated with 100 µg/ml cycloheximide (Sigma) to block *de novo* protein synthesis 24–36 h after transfection. At the indicated time points (0 h or no cycloheximide, 30 min and 1–4, 6, 10, and 24 h), cell lysates were fractionated on a 8% SDS-PAGE followed by immunoblotting to visualize Ca<sub>v</sub>α2δ1 (Alomone Labs, 1:750) and GAPDH (Sigma, 1:10,000). Protein density Ca<sub>v</sub>α2δ1 in total lysates was estimated with ImageLab 5.2 (Bio-Rad). It was expressed relative to GAPDH and normalized to the relative protein density of Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT measured at time 0. The time course of degradation was measured in 3–5 experiments. Each symbol represents the mean ± S.E. of the normalized protein density.

**Isolation of the Plasma Membrane Fraction from Cardiomyocytes and HEKT Cells**—Four different protein fractions (total cell lysates, cytosolic, total membrane, and plasma membrane fraction) were prepared according to a protocol published previously (50). Briefly, transfected HEKT cells cultured in 100-mm dishes were homogenized at 4 °C in a Tris-based solution containing a mix of protease inhibitors (Sigma) and 1 mM EDTA, pH 7.4. The cell homogenate was aliquoted into three tubes. After a 2-h incubation period at 4 °C with 1% (v/v) Triton X-100, the first tube was centrifuged at 10,000 × g for 10 min to remove cell debris, nuclei, and mitochondria. The supernatant was kept as the total protein fraction (whole-cell lysates). The second tube was centrifuged at 200,000 × g and 4 °C for 20 min.



## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

The supernatant is referred to as the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in homogenizing buffer containing 1% (v/v) Triton X-100. After 30 min of incubation on ice, a second centrifugation was done at  $200,000 \times g$ . The resulting supernatant is referred to as the total membrane protein fraction. The third tube was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. The supernatant obtained was centrifuged at  $200,000 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  for 20 min. The pellet was resuspended in the homogenizing buffer containing 0.6 M KCl. Subsequent centrifugations were performed at  $200,000 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  for 20 min to wash out KCl. The final pellet was resuspended in the homogenizing buffer and is considered to be enriched in plasma membrane proteins. Proteins were electrophoresed on an 8% SDS-polyacrylamide gel and blotted with the anti- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  (Aviva System Biology 1:1000).

**Flow Cytometry Assays**—Flow cytometry experiments were conducted as described elsewhere (22). Stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells were transiently transfected simultaneously with pCMV- $\text{Ca}_v1.2$  WT and pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or mutants. To determine cell surface expression level of the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA proteins, cells were harvested 24 h after transfection, washed in a  $1 \times$  PBS buffer, and stained with the FITC-conjugated mouse monoclonal anti-HA epitope tag antibody at  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma) at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min. To determine the total quantity of both intracellular and extracellular expression of the tagged proteins, cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> fixation/permeabilization solution kit (BD Biosciences) (22). Roughly 10,000 cells were counted using a FACSARIA III<sup>®</sup> SORP (Special Order Research Product) flow cytometer (BD Biosciences) at the flow cytometry facility hosted by the Department of Microbiologie, Infectiologie, and Immunologie at the Université de Montréal. The level of fluorescence detected with the IgG1-FITC isotype control murine ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) or with the anti-HA FITC-conjugated antibody ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in HEKT untransfected cells was not significantly different from the fluorescence measured in the complete absence of fluorophore (22). Control conditions were carried out in triplicate with each series of experiments as follows: (a) untransfected  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells without anti-HA FITC-conjugated antibody; (b) untransfected  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells with the anti-HA FITC-conjugated antibody to assess the level of background staining; and (c)  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells transfected with pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT. Expressing the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT constructs in HEKT cells produced a significant 3-log increase in the FITC fluorescence ( $x$  axis) and mCherry fluorescence ( $y$  axis) on the two-dimensional plots (22).

**Quantification of Steady-state Cell Surface Expression by Flow Cytometry Assays**—Flow cytometry data were analyzed using the FlowJo software, version 10 (TreeStar, Ashland, OR) as described (22). Relative expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  was calculated based on  $\Delta$ mean fluorescence intensity ( $\Delta\text{MFI}$ ) for each fluorophore (mCherry or FITC) as explained elsewhere (22). Briefly, the positive cell gate (P2) and the negative cell gate (P3) were set manually. The fluorescence intensity within the region delineated by the P2 and P3 gates was displayed as cell count *versus* fluorescence intensity. The  $\Delta\text{MFI}$  for FITC was calculated by subtracting the FITC fluorescence density of the FITC-negative cells (P3) from the fluorescence density of the FITC-

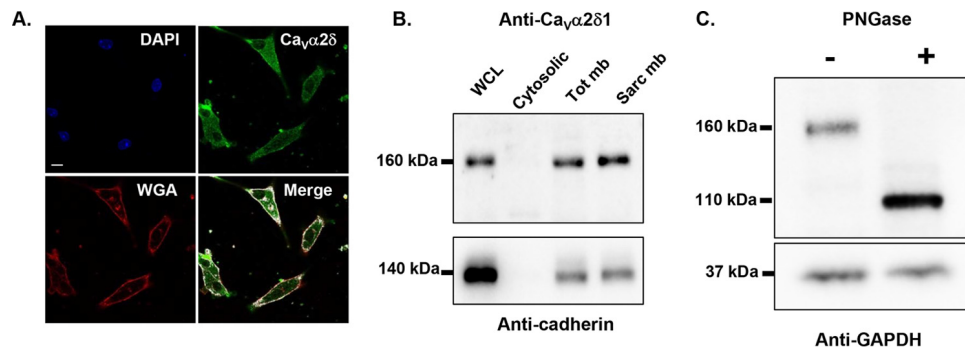
positive cells (P2). The same method was used to calculate the  $\Delta\text{MFI}$  for mCherry. Under our experimental conditions, the fluorescence intensity follows a normal distribution, hence the mean was equivalent to the median for all intents and purposes.  $\Delta\text{MFI}$  for FITC measured in intact non-permeabilized cells was used as a relative index of the steady-state cell surface density of the HA-tagged  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . The  $\Delta\text{MFI}$  values for FITC were measured in permeabilized cells to confirm the accessibility of the HA epitope. It is also a valid estimation of the total protein density because the relative  $\Delta\text{MFI}$  values for FITC estimated in permeabilized cells are comparable with the relative  $\Delta\text{MFI}$  values for mCherry measured under the same conditions.  $\Delta\text{MFI}$  values were normalized to the maximum value measured the same day for mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT expressed under the same conditions to account for variations in the absolute fluorescence intensity of the anti-HA FITC-conjugated antibody. The  $\Delta\text{MFI}$  values for FITC and mCherry obtained over the course of several months were pooled and are reported in Table 1, along with the number of triplicate experiments. The normalized  $\Delta\text{MFI}$  values for mCherry measured for each mutant in intact and permeabilized cells were not significantly different from one another ( $p > 0.05$ ) suggesting that the cell permeabilization procedure did not distort significantly the relative fluorescence readout.

**Patch Clamp Experiments in HEKT Cells**—Whole-cell patch clamp experiments were carried out in isolated cells after transfection in HEKT  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells in the presence of the pGFP vector ( $0.2 \mu\text{g}$ ) as a control for transfection efficiency. Electrodes were filled with a solution containing (in mM) 140 CsCl, 0.6 NaGTP, 3 MgATP, 10 EGTA, 10 HEPES and titrated to pH 7.3 with NaOH. Cells were bathed in a modified Earle's saline solution (in mM) containing 135 NaCl, 20 TEACl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES and titrated to pH 7.3 with KOH. On-line data acquisition was achieved with the Axopatch 200-B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) connected with the PClamp software Clampex 10.5 through the Digidata 1440A acquisition system (Molecular Devices) (22). A series of 450-ms voltage pulses were applied from a holding potential of  $-100$  mV at a frequency of 0.2 Hz, from  $-60$  to  $+70$  mV at 5-mV intervals. Series resistance was compensated to  $\sim 85\%$  after on line capacitive transient cancellation. Unless stated otherwise, whole-cell currents were sampled at 5 kHz and filtered at 1 kHz. PClamp software Clampfit10.5 was used for data analysis. Mid-potential of activation values ( $E_{0.5, \text{act}}$ ) were estimated from the peak  $I$ - $V$  curves obtained for each channel composition and were reported as the mean of individual measurements  $\pm$  S.E (Table 2) (22, 53). The free energy of activation was calculated using the mid-activation potential as shown in Equation 1,

$$\Delta G_{\text{act}} = z \cdot F \cdot E_{0.5, \text{act}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $z$  is the effective charge displacement during activation, and  $F$  is the Faraday constant (54). The  $r_{100}$  ratio is defined as the ratio of peak whole-cell currents remaining after a depolarizing pulse of 100 ms ( $I_{100\text{ms}}/I_{\text{Peak}}$ ) and was used as an indicator of the inactivation kinetics. The pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA construct was previously shown to carry the functional modulation of  $\text{Ca}_v1.2$  currents (22). Each novel pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA

## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex



**FIGURE 1.** *A*, endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins in mouse cardiomyocytes are glycoproteins. Endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  in 24-h cultured mouse cardiomyocytes co-localized with wheat germ agglutinin 647 (WGA 647), a plasma membrane marker that displays a high affinity for glycoproteins.  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins were stained with the anti- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  as the primary antibody and Alexa 488-coupled secondary antibody. Scale bar corresponds to 10  $\mu\text{m}$ . The red channel was arbitrarily assigned to WGA, and the green channel was assigned to  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . Nuclei are stained with DAPI (blue). Co-localization pixel maps of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  and WGA are shown in white and were produced using the co-localization finder plugin in FIJI. *B*, endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins in the sarcolemmal membrane fraction of mouse cardiomyocytes migrate at 160 kDa. Four different protein fractions (total (WCL), cytosolic (Cyt), total membrane (Tot mb), and sarcolemmal membrane (Sarc mb)) were isolated from ventricles of adult CD-1 mice (50). Proteins were electrophoresed on an 8% SDS-polyacrylamide denaturing gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with an anti- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (Aviva System Biology). The membrane was probed, after stripping, with anti-pan-cadherin (Invitrogen 1:5000) as a quality control for the fractionation process. It is worth noting that the 160-kDa protein is the dominant species in whole-cell lysates. Each lane was loaded with 10  $\mu\text{g}$  of proteins. *C*, PNGase F-mediated deglycosylation of the N-linked sugars in endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins from mouse cardiomyocytes. Total whole-cell proteins isolated from ventricles of adult CD-1 mice were denatured 20 min at 60  $^\circ\text{C}$  before incubation in the absence (–) or presence (+) of PNGase F during 1 h at 37  $^\circ\text{C}$ . Each lane was loaded with 20  $\mu\text{g}$  of proteins. Proteins were electrophoresed on an 8% SDS-polyacrylamide denaturing gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with an anti- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (Alomone Labs) (top panel) and anti-GAPDH (bottom panel) as a loading control.

mutant was tested alongside the control WT construct (pCMV- $\text{Ca}_v1.2$  WT + pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT with  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells) to assess for internal consistency thus explaining the large sample size for the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT construct. Experiments performed under the same conditions yielded peak current densities that could vary by as much as  $\pm 35\%$  between each series of experiments. This variation appeared to be essentially linked to minor changes in the cell density at the time of transfection. Data from all experiments performed under the same conditions over a period of 16 months were pooled, and biophysical properties are reported in Table 2. Experiments were performed at room temperature (18–20  $^\circ\text{C}$ ).

**Statistics**—Results were expressed as mean  $\pm$  S.E. Tests of significance were carried out using the unpaired analysis of variance with the Tukey test embedded in the Origin 7.0 analysis software (OriginLab Corp., Northampton, MA). Data were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

### Results

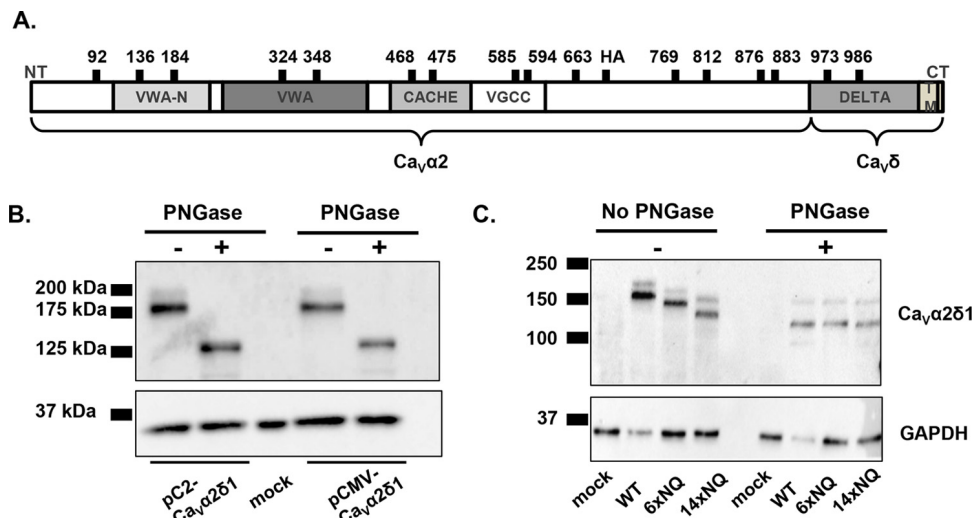
**Cardiac  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  Proteins Are Glycosylated**— $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is largely believed to be the most heavily glycosylated protein within the cardiac L-type channel complex (32). Triple-color immunostaining of cultured mouse cardiomyocytes with wheat germ agglutinin (WGA), a plasma membrane marker that binds glycoproteins with high affinity, DAPI, a marker for the nucleus, and an anti- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  demonstrated that the glycoprotein  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  co-localized with WGA (Fig. 1*A*). The expression of the endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  in the sarcolemmal membrane-enriched fraction in mouse cardiomyocytes was confirmed by membrane fractionation followed by SDS-PAGE. As seen, the major protein species migrated at an apparent molecular mass of 160 kDa in all fractions (Fig. 1*B*), which is similar to the mobility of the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein expressed in brain (29). Given that the calculated molecular mass of the rodent  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is 124 kDa, this suggests the native protein undergoes significant

co- or post-translational modifications. To note, partially glycosylated species were not detected under our experimental conditions. Enzymatic deglycosylation carried out with PNGase F, an amidase that removes all saccharide moieties and reduced the electrophoretic mobility of the endogenous protein from 160 to 110 kDa (Fig. 1*C*). The 50-kDa decrease in the mobility of endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is compatible with the addition of N-glycans onto 10–14 N-glycosylation sites (26, 27, 31).

**Molecular Identification of N-Glycosylation Sites in  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$** —By definition, N-linked glycans are attached to the nitrogen atom of an asparagine side chain within the Asn-Xaa-(Ser/Thr) consensus sequence, where Xaa is not a proline residue. It is estimated that at least two-thirds of those sites are likely to be N-glycosylated (55). Using this strict definition, we identified 16 putative glycosylation sites in the extracellular portion of the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein as follows: Asn-92, Asn-136, Asn-184, Asn-324, Asn-348, Asn-468, Asn-475, Asn-585, Asn-594, Asn-663, Asn-769, Asn-812, Asn-876, Asn-883, Asn-973, and Asn-986 in the rat isoform (Fig. 2*A* and data not shown). Seven sites are conserved in the primary sequence of the human, rat, and mouse  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  as follows: Asn-92, Asn-184, Asn-348, Asn-468, Asn-594, Asn-663, and Asn-812. The Asn-348 and Asn-468 sites are also conserved in  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 2$ . Many Asn-Xaa-Ser sites are glycosylated inefficiently *in vitro* (56), whereas Asn-Xaa-Thr sites are usually efficiently glycosylated. Even though the presence of the Asn-Xaa-(Ser/Thr) site is necessary for the receipt of an N-glycan, transfer of the N-glycan to this site does not always occur, due to conformational or other constraints during glycoprotein folding (55). Enzymatic digestion with PNGase F carried out with whole-cell lysates from recombinant  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  expressed in HEK293 cells also demonstrated a reduction of 50 kDa in the electrophoretic mobility of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (Fig. 2*B*), similar to the one observed above for the endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein. The mobility shift assay also suggests that the  $\text{Ca}_v\delta$  protein may not be proteolytically



## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex



**FIGURE 2. PNGase F-mediated deglycosylation of the N-linked sugars from  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  expressed in HEKT.** A, relative positions of the predicted N-glycosylation sites are shown on the structural domains of the rat  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . Structural domains were identified using protein BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov) with the UniProtKB/Swiss-Prot database. The four structural domains are shown by boxes: VWA-N (NCBI pfam08399), VWA (NCBI smart00327), CACHE (NCBI pfam02743), and VGCC (NCBI pfam08473). B, cells were transiently transfected with pCMV- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  or pC2- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . Total cell lysates were extracted 24 h after transfection using the protocol described earlier. Total cell lysates were denatured 10 min at 95 °C before incubation in the absence (–) or presence (+) of PNGase during 1 h at 37 °C. Proteins were electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide denaturing gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with an anti- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (Alomone Labs) and anti-GAPDH as a loading control. Each lane was loaded with 10  $\mu\text{g}$  of proteins. As seen, the electrophoretic mobility of the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein decreased by 50 kDa following enzymatic digestion. C, mutations of multiple glycosylation sites decreased protein mobility. HEKT cells were transiently transfected with pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT, 6xNQ, or 14xNQ. Exactly 24 h after transfection, cells were lysed, and protein lysates were either treated with the vehicle buffer or with PNGase F during 1 h at 37 °C. Proteins were fractionated by SDS-PAGE (8%). Western blot analysis was carried out with the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  antibody (Alomone Labs) as the primary antibody, and signal was detected using the Bio-Rad ECL substrate. The 2nd lanes ( $\pm$  PNGase) were loaded with 5  $\mu\text{g}$  of proteins, and the 1st, 3rd, and 4th lanes were loaded with 10  $\mu\text{g}$ . 1st lane, mock-transfected HEKT cells; 2nd lane, pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT; 3rd lane, pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA 6xNQ; 4th lane, pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA 14xNQ. The calculated molecular masses for the high density band are before treatment with PNGase as follows: 2nd lane, 171 kDa; 3rd lane, 155 kDa; 4th lane, 133 kDa; after digestion with PNGase: 2nd lane, 123 kDa; 3rd lane, 123 kDa; and 4th lane, 123 kDa. The 10-kDa difference in the molecular masses between the 14xNQ before and after treatment with PNGase could suggest that N-glycosylation was not completely eliminated in the 14xNQ mutant or else that the enzymatic treatment itself altered the migration of the protein in the gel.

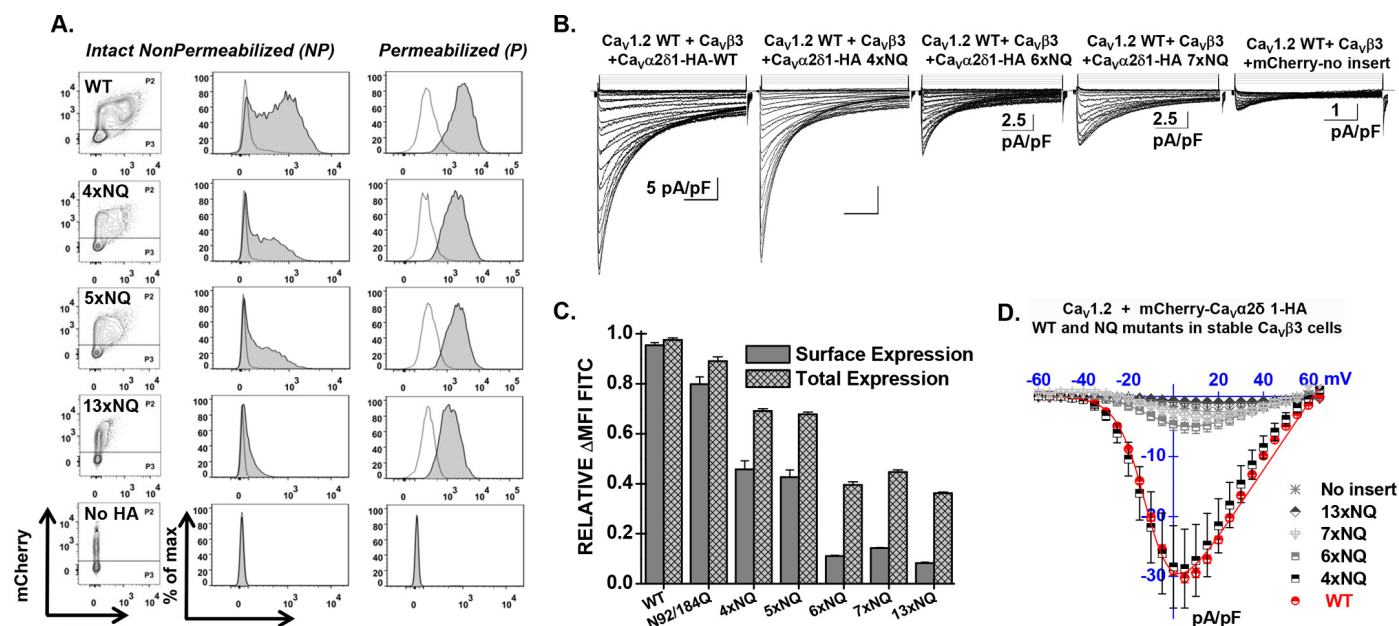
cleaved under our experimental conditions (57, 58). The molecular determinants responsible for N-type glycosylation were investigated using a mutational analysis. Multiple Asn to Gln mutants were produced in the pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA construct that was previously shown to be expressed at the plasma membrane and fully functional (22). The glycosylation status of multiple constructs 6xNQ (N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q) that includes the six Asn sites that were predicted to be the most likely to be glycosylated and the 14xNQ construct (N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/N468Q/N585Q/N594Q/N663Q/N769Q/N812Q/N876Q/N883Q/N986Q/N1066Q) that includes the 14 Asn sites with a likelihood above 0.5 (59) were first investigated. Western blots produced with whole-cell lysates showed that pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT migrated as a doublet with a faint band at  $\approx 200$  kDa and a stronger band  $\approx 175$  kDa (Fig. 2C). The 6xNQ and the 14xNQ proteins produced a band pattern of significantly weaker intensity with protein mobility reduced by  $\approx 25$  and  $\approx 45$  kDa, respectively (Fig. 2C), suggesting that acquisition of N-glycans was not completely impaired in the 6xNQ and the 14xNQ mutants. Indeed, enzymatic digestion with PNGase F further reduced the electrophoretic mobility and produced similar migration profiles for the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT, 6xNQ, and the 14xNQ proteins. Altogether, this observation supports the view that some of the Asn residues mutated in the 6xNQ construct (Asn-92, Asn-184, Asn-348, Asn-594, Asn-812, and/or Asn-876), some of the additional residues substituted in the 14xNQ construct (Asn-136, Asn-468, Asn-585, Asn-

663, Asn-769, Asn-883, Asn-986, and/or Asn-1066), and possibly the two remaining residues (Asn-475 and Asn-973) are acquiring N-glycans either co-translationally or post-translationally.

**Disrupting Six Asn Sites Impaired Steady-state Surface Density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$** —To evaluate whether the partially glycosylated forms reach the plasma membrane, we quantified the cell surface fluorescence of the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT and NQ constructs in two-color flow cytometry assays. In this construct, the mCherry fluorescence is constitutive. The fluorescence of the FITC-conjugated HA antibody was shown to be proportional to the fraction of proteins present at the cell surface because the HA epitope is located in the extracellular portion of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (22). The fluorescence intensity  $\Delta\text{MFI}$  for FITC measured in intact cells, observed as a rightward shift in the fluorescence intensity on the x axis of the two-dimensional plots, provides a reliable index of the steady-state cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . The mCherry epitope expressed at the C terminus of the construct, observed as an increase in the fluorescence intensity seen on the y axis of the two-dimensional plots, served as a marker for total protein expression. The two-color assay thus provided a quick and reliable readout of protein expression. Control experiments carried out with the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  WT control construct that was not HA-tagged confirmed the specificity of the FITC antibody in these series of experiments (Fig. 3A). The fluorescence histograms for the corresponding experiment were reported to the right of the contour plots, whereas the averaged mean fluorescence intensity

F3

## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex



**FIGURE 3. Simultaneous mutations of six N-glycosylation sites disrupt cell surface expression of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  and prevent the stimulation of  $\text{Ca}_v1.2$  currents.** Stable  $\text{Ca}_v\beta3$  cells were transiently transfected simultaneously with pCMV- $\text{Ca}_v1.2$  WT and pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA WT or mutants. **A**, representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence are shown for each N-glycosylation mutants (NQ) after the disruption of four sites (4xNQ), five sites (5xNQ), and 13 sites (13xNQ). The No HA construct is mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  WT. The distribution of the fluorescence intensity measured for cells within the P2 gate (fluorescence-positive cells) are shown in gray, and the distribution of fluorescence intensity for cells present in the P3 gate (fluorescence-negative cells) is displayed as an overlay in a transparent gray plot. In all cases, the  $\Delta\text{MFI}$  fluorescence measured for FITC in permeabilized cells was qualitatively similar to the constitutive fluorescence measured for mCherry validating the accessibility of the HA epitope and confirming the values obtained for total protein expression. Numerical values are shown in Table 1 and data not shown. **B**, representative whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  current traces obtained after recombinant expression of  $\text{Ca}_v1.2$  in stable  $\text{Ca}_v\beta3$  cells with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA WT or mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA glycosylation NQ mutants. The same mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA constructs were used for the flow cytometry assays and the patch clamp experiments. Currents were recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  from a holding potential of  $-100$  mV. Time scale is 100 ms throughout. Unless specified otherwise, the current density scale is 5 pA/pF. Co-expression with  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  shifted the voltage dependence of activation of  $\text{Ca}_v1.2$  WT/ $\text{Ca}_v\beta3$  from  $E_{0.5, \text{act}} = 8 \pm 2$  mV ( $n = 345$ ) (no  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ ) to  $E_{0.5, \text{act}} = -9.4 \pm 0.2$  mV ( $n = 231$ ) (for  $\text{Ca}_v1.2$  WT/ $\text{Ca}_v\beta3$  with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA WT), a significant  $-15$ -mV shift in the activation potential. The free energy of activation ( $\Delta G_{\text{act}}$ ) measured in the presence of mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA WT was well described by a Gaussian distribution centered at  $-0.86 \pm 0.2$  kcal mol $^{-1}$  ( $n = 231$ ). **C**, bar graph shows the normalized  $\Delta\text{MFI}$  measured in the presence of FITC in intact (surface expression) or permeabilized cells (total expression) in flow cytometry experiments. **D**, averaged current-voltage relationships, recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , are shown for mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA WT, and the multiple mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA mutants 4xNQ (N92Q/N348Q/N594Q/N876Q), 6xNQ (N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q), 7xNQ (N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q/N986Q), 13xNQ (N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/N468Q/N585Q/N594Q/N769Q/N812Q/N876Q/N883Q/N986Q/N1066Q). Currents traces obtained with the mCherry vector are also shown. See Tables 1 and 2 for analysis of the statistical significance.

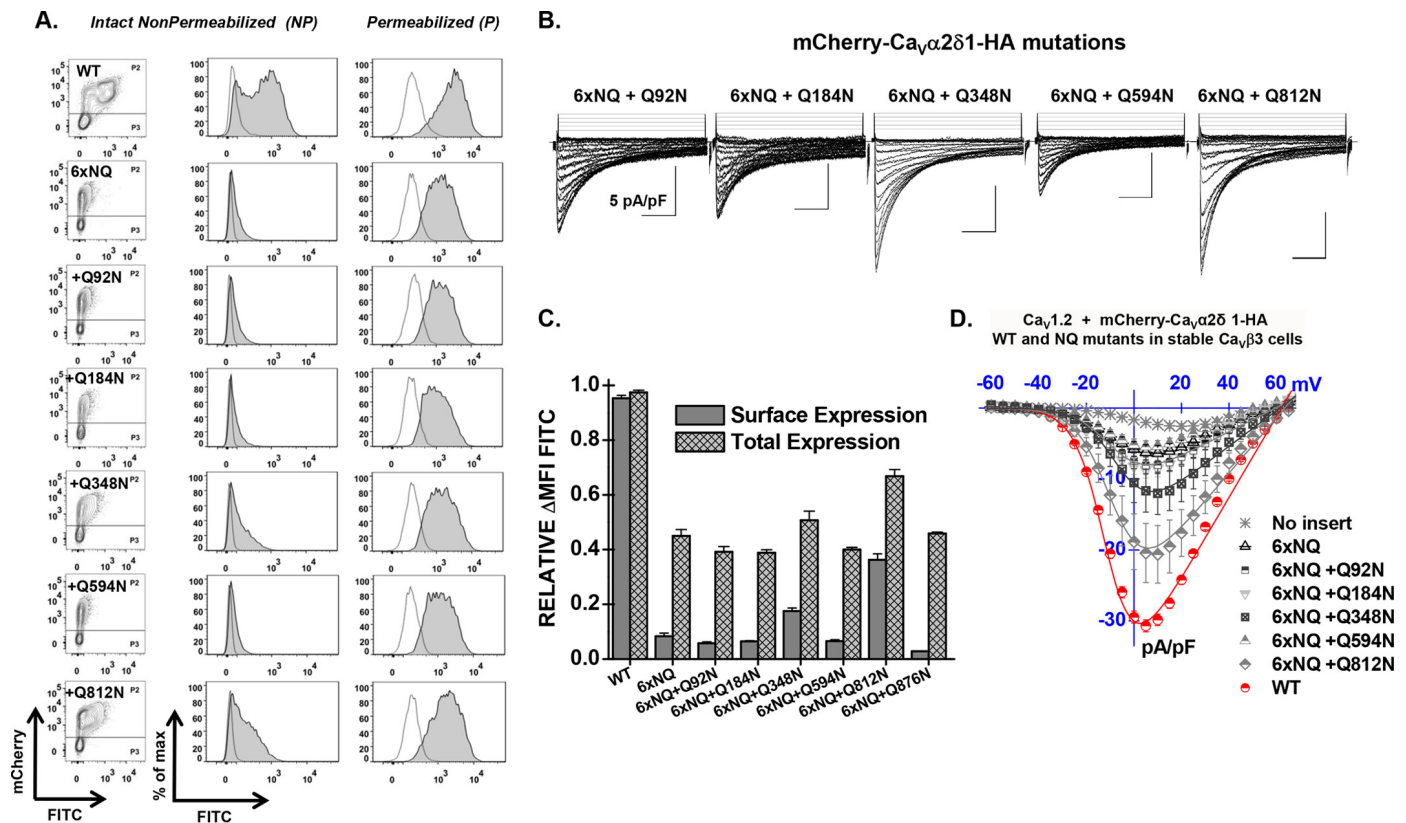
values ( $\Delta\text{MFI}$ ) obtained from  $\geq 3$  distinct experiments are shown in Fig. 3C. As seen, the fluorescence intensity  $\Delta\text{MFI}$  for FITC in intact nonpermeabilized cells was strong for the WT and the 4xNQ construct but sharply decreased from the 5xNQ to the 13xNQ constructs (data not shown). These constructs produced proteins that were almost absent from the cell surface. Nonetheless, a slightly different version of the 6xNQ mutant (N92Q/N184Q/N468Q/N594Q/N876Q/N986Q) was present at the cell surface at a density similar to the 4xNQ mutant (data not shown). Assays were also conducted after cell permeabilization, and the fluorescence histograms shown alongside confirmed the accessibility of the HA epitope. Altogether, these results suggest the following: 1) mutations of consensus N-glycosylation sites are associated with decreased steady-state cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ ; 2) mutations of consensus N-glycosylation sites impaired total protein density; and 3) N-glycosylation sites may not all be functionally equivalent.

**Disrupting Asn Sites Impairs Channel Function**—Mutating the consensus N-linked glycosylation reduced the steady-state cell surface density of the  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  protein. Its impact on the L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channel function was explored after recombinant expression of  $\text{Ca}_v1.2$  with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA multi-

ple NQ mutants in stable  $\text{Ca}_v\beta3$  cells. As reported before (22), co-expression of pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA WT with  $\text{Ca}_v1.2$  WT in stable  $\text{Ca}_v\beta3$  cells stimulated whole-cell peak current densities from  $-3 \pm 1$  pA/pF ( $n = 29$ ) (no insert in the pmCherry vector) to  $-30 \pm 1$  pA/pF ( $n = 231$ ) in the presence of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  WT (Fig. 3, B and D). The increase in peak current densities was associated with an  $\approx -15$ -mV leftward shift in the activation potential of  $\text{Ca}_v1.2$  from  $E_{0.5, \text{act}} = 8 \pm 2$  mV ( $n = 35$ ) (no  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ ) to  $E_{0.5, \text{act}} = -9.6 \pm 0.1$  mV ( $n = 231$ ) (with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA). As seen, co-expression with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA mutants containing 4 (4xNQ), 6 (6xNQ), and 13 (13xNQ) mutations yielded voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents. Mutating four sites did not appreciably alter whole-cell peak current density, but mutations of two additional consensus sites in the 6xNQ mutant (N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q) was sufficient to significantly decrease by 6-fold the peak current density of  $\text{Ca}_v1.2$  currents. Furthermore, peak current densities measured with the 13xNQ mutant were not statistically different from  $\text{Ca}^{2+}$  currents obtained in the absence of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  (data not shown). These results suggest that residues Asn-184 and Asn-812 could be among the most critical residues in carrying channel modulation.



## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex



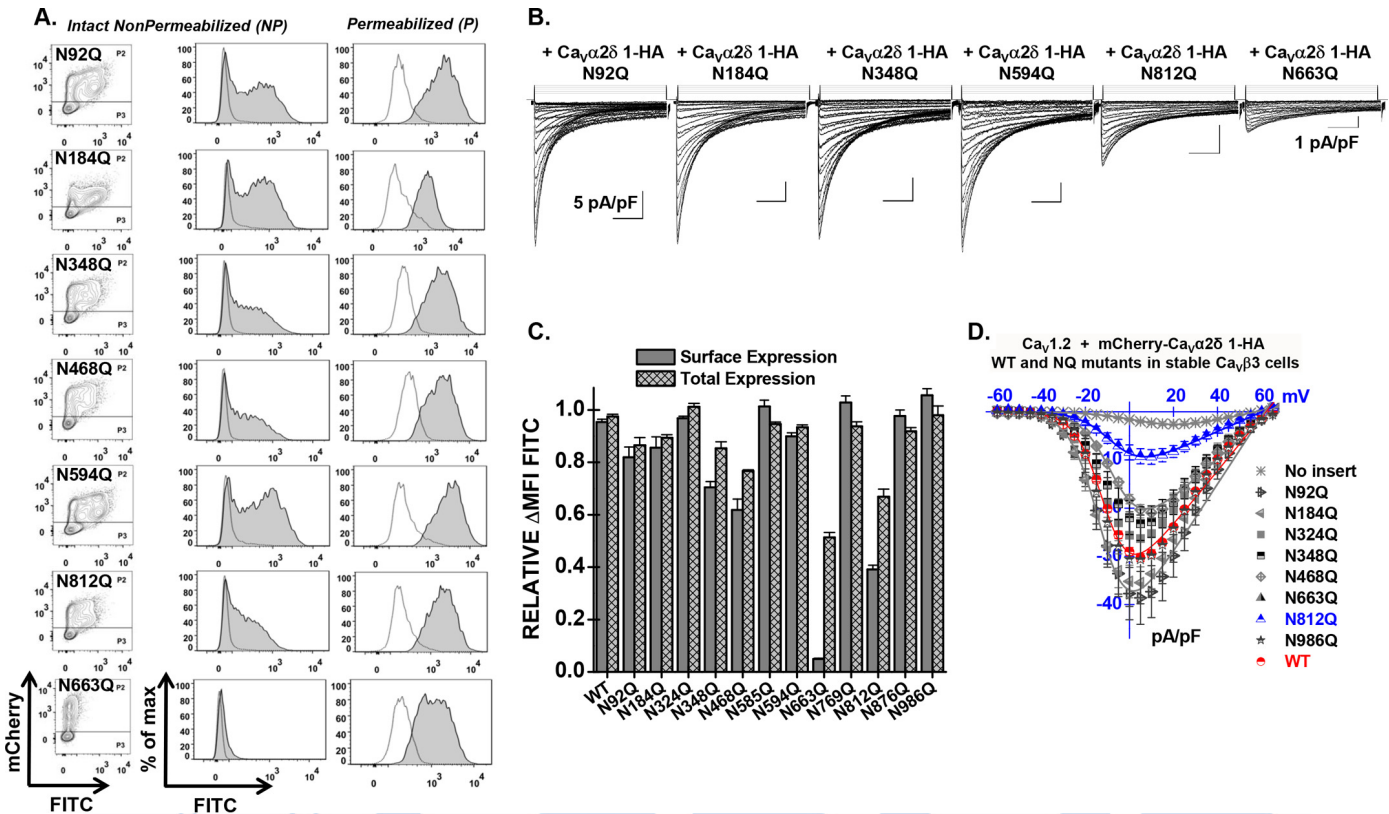
**FIGURE 4. Reverse mutation Q812N cancels the impact of the 6xNQ mutant on  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .** A, representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence are shown for each N-glycosylation mutant (NQ). The 6xNQ construct (N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q) was used as a template from which single point reverse mutations were introduced as indicated. As seen, only the reverse mutations Q348N and Q812N effectively expressed at the cell surface. B, representative whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  current traces obtained after recombinant expression of  $\text{Ca}_v 1.2$  in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N-glycosylation mutants (NQ). C, bar graph shows the normalized  $\Delta \text{F}/\text{FITC}$  measured in the presence of FITC in intact (surface expression) or permeabilized cells (total expression) in flow cytometry experiments. D, averaged current-voltage relationships, recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , are shown for the reverse mutations mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA 6xNQ + Q92N (N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q); 6xNQ + Q184N (N92Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q); 6xNQ + Q348N (N92Q/N184Q/N594Q/N812Q/N876Q); 6xNQ + 594N (N92Q/N184Q/N348Q/N812Q/N876Q); and 6xNQ + Q812N (N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N876Q). As a control for relative expression, functional modulation by mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT was measured under the same conditions (data not shown). See Tables 1 and 2 for statistical significance.

**Only a Few Asn Residues Contribute to  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  Function—** Cell surface density, protein stability, and channel function were significantly impaired in the 6xNQ construct. To identify the individual contribution of each residue to the functional response, reverse Gln to Asn mutations were introduced in the 6xNQ construct. As seen, reinstating the Asn-812 site, with the “6xNQ + Q812N” mutant, nearly restored the steady-state cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  and L-type channel function (Fig. 4, A and B). Reintroducing Asn-348 with the “6xNQ + Q348N” mutant was also seen to significantly improve cell surface density and channel function. These data suggest that N348Q could account for the large decrease in the cell surface density of the 4xNQ mutant. In both cases, the increase in the relative cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (Fig. 4C) was correlated with an augmentation of the peak current density as compared with the 6xNQ mutant (Fig. 4D). In addition, the mean  $\Delta \text{F}/\text{FITC}$  in permeabilized cells (an index of total cell density) increased in these two reverse mutants suggesting that protein stability and/or synthesis was also improved as compared with the 6xNQ mutant (Fig. 4C). The individual impact of each Asn site was finally investigated in single point mutations. Sixteen single Asn to Gln mutations were tested (N92Q; N136Q; N184Q; N324Q; N348Q; N468Q; N475Q; N585Q; N594Q; N663Q;

N769Q; N812Q; N812A; N876Q; N883Q; N973Q; and N986Q) (Fig. 5 and Table 1). Most single mutations only caused small changes in the relative fluorescence intensity at the cell surface without significant change in channel gating, suggesting that these single mutants reached the cell surface in their native conformation. One can suppose that small changes in the surface fluorescence could result from minor alterations in the protein trafficking or protein conformation. Nine mutations (N136Q; N324Q; N475Q; N585Q; N594Q; N769Q; N876Q; N883Q; and N986Q) produced fluorescent patterns for FITC and mCherry not significantly different ( $p > 0.05$ ) than the wild-type construct suggesting that neither surface density nor protein stability was affected by these single mutations. Three single mutations mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N184Q, and mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N973Q produced proteins that yielded slightly smaller fluorescent signals (by  $\approx 15$ –20%) than the control mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT construct ( $p < 0.05$ ). However, all these above-mentioned single NQ mutants stimulated peak currents to the same extent as the wild-type construct ( $p > 0.05$ ) (Table 2).

Four single point mutations (N348Q; N468Q; N663Q; and N812Q) significant decreased the fluorescence at the cell surface ( $p < 0.001$ ). The strongest impact produced by a single

# N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex



**FIGURE 5. Single mutations N663Q and N812Q decrease cell surface expression of Ca<sub>v</sub>α2δ1 and modulation of Ca<sub>v</sub>1.2 whole-cell currents.** *A*, representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence are shown for each mutation as stated. *B*, representative whole-cell Ca<sup>2+</sup> current traces recorded after recombinant expression of Ca<sub>v</sub>1.2 in stable Ca<sub>v</sub>β3 cells with mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or some *N*-glycosylation single mutants. Unless specified otherwise, the current density scale is 5 pA/pF. Functional modulation by mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT was measured under the same experimental conditions (data not shown). *C*, bar graph shows the normalized ΔF/FITC measured in the presence of FITC in intact (surface expression) or permeabilized cells (total expression). *D*, current-voltage relationships, recorded in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup>, are shown for the single mutations mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N92Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N184Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N324Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N348Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N468Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N663Q, mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N812Q, and mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA N986Q. Statistical significance is reported Tables 1 and 2.

mutation was obtained with N663Q that eradicated cell surface fluorescence and channel function (Fig. 5 and Tables 1 and 2). N812Q and N812A also produced proteins that significantly decreased cell surface fluorescence. Data from the flow cytometry assays were corroborated with confocal images captured with live cells stained with the FITC-conjugated anti-HA tag antibody. Cell surface fluorescence intensity decreased sharply for the 6xNQ mutant and was noticeably weaker for the single N812Q mutant than for the wild-type construct (Fig. 6). In agreement with the fluorescence data, N812Q generated currents that were twice larger than the 6xNQ mutant but ≈3 times smaller than currents produced with the wild-type construct (*p* < 0.01) (Table 2).

The potentially additive effect of these residues (save for N663Q that was already non-functional on its own) was investigated in double mutants. Pairing Asn sites in different combinations, to form double mutants N348Q/N468Q, N348Q/N812Q, and N468Q/N812Q, produced proteins that significantly reduced the steady-state cell surface density of Ca<sub>v</sub>α2δ1 and modulation of Ca<sub>v</sub>1.2 currents (Fig. 7, Tables 1 and 2; and data not shown). Pairing N92Q with either N348Q, N468Q, or N812Q as one of the partners yielded voltage-activated currents that were roughly 50% lower than produced with the wild-type construct. In contrast, other mCherry-

Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA double NQ mutants (N92/N184Q, N92Q/N594Q, N136Q/N184Q, N136Q/N769Q, and N594Q/N876Q) produced whole-cell currents similar to the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT construct (*p* > 0.05). The series of wild-type-like double mutants include N136Q/N184Q previously shown to prevent the subunit-mediated regulation of Ca<sub>v</sub>2.2 currents (60). These results suggest that Asn-348, Asn-468, Asn-663, and Asn-812 in Ca<sub>v</sub>α2δ1 play unique roles in the modulation of Ca<sub>v</sub>1.2.

Mutations of these sites produced Ca<sub>v</sub>α2δ1 proteins with impaired *N*-glycosylation. Mobility shift assays were carried out before and after digestion with PNGase F in three separate series of experiments as follows: with double mutants N136Q/N184Q, N348Q/N468Q, N348Q/N812Q, and N468Q/N812Q (Fig. 8*A*), multiple mutants that were not detected at the membrane N348Q/N468Q/N812Q and N92Q/N184Q/N348Q/N468Q/N594Q/N812Q (Fig. 8*B*), and single N663Q (Fig. 8*C*). Under control conditions, there was a small but significant decrease in the protein mobility (<10 kDa) for the double mutants when compared with the WT construct and a smaller one with single mutants, although this was not always clearly evident. Digestion with PNGase F decreased the electrophoretic mobility of N663Q, as well as the double, triple, and sextuple mutants, respectively by 48, 45, 40, and 30 kDa, respec-



# N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

**TABLE 1**

**Relative fluorescence intensity  $\Delta$ MFI for Cherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT and mutants**

$\text{Ca}_v1.2$  WT was co-expressed in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  HEKT cells with pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or mutant using a 1:1 DNA ratio. Flow cytometry experiments were conducted to determine cell surface expression levels of tagged proteins, and fluorescence intensity was measured with the FlowJo software as described under "Experimental Procedures." Relative expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  was calculated based on  $\Delta$ MFI estimated for each fluorophore (mCherry or FITC).  $\Delta$ MFI for FITC measured in intact non-permeabilized cells was used as an index of the cell surface density of the HA-tagged  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , and  $\Delta$ MFI values for FITC measured in permeabilized cells reflect the total protein expression (cell surface and intracellular protein density). The  $\Delta$ MFI values for the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA mutants were pooled and normalized to the maximum value obtained for pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT that was expressed under the same conditions and measured the same day. The total number of experiments is provided in parentheses. The  $\Delta$ MFI values for FITC measured in permeabilized cells were mostly similar to the  $\Delta$ MFI for mCherry measured in intact and permeabilized cells. Furthermore, the  $\Delta$ MFI values for mCherry measured in intact and permeabilized cells were found to be within experimental error suggesting that cell permeabilization did not significantly alter the protein structure. Statistical analysis was carried out against the  $\Delta$ MFI for FITC measured with pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

| mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA mutant<br>with $\text{Ca}_v1.2$ WT in<br>$\text{Ca}_v\beta 3$ stable HEKT cells | $\Delta$ MFI FITC                             |   | $\Delta$ MFI mCherry                        |   |
|--|---|---|---|---|
|  | Intact cells<br>(Relative surface<br>density) | Perm cells<br>(Relative total<br>density) | Intact cells<br>(Relative total<br>density) | Perm cells<br>(Relative total<br>density) |
| + mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT  | 0.96 $\pm$ 0.02 (66)                          | 0.97 $\pm$ 0.01 (66)                      | 0.97 $\pm$ 0.01 (66)                        | 0.97 $\pm$ 0.01 (66)                      |
| N92Q   | 0.82 $\pm$ 0.04 (12)*                         | 0.87 $\pm$ 0.02 (12)*                     | 0.86 $\pm$ 0.05 (12)*                       | 0.88 $\pm$ 0.04 (12)*                     |
| N136Q  | 0.98 $\pm$ 0.03 (3)                           | 0.98 $\pm$ 0.03 (3)                       | 1.02 $\pm$ 0.04 (3)                         | 1.1 $\pm$ 0.1 (3)                         |
| N184Q  | 0.86 $\pm$ 0.04 (6)*                          | 0.89 $\pm$ 0.01 (6)*                      | 0.93 $\pm$ 0.02 (6)                         | 0.86 $\pm$ 0.03 (6)*                      |
| N324Q  | 0.97 $\pm$ 0.01 (6)                           | 1.02 $\pm$ 0.01 (6)                       | 0.99 $\pm$ 0.01 (6)                         | 1.01 $\pm$ 0.02 (6)                       |
| N348Q  | 0.68 $\pm$ 0.02 (12)**                        | 0.86 $\pm$ 0.02 (12)*                     | 0.84 $\pm$ 0.01 (12)*                       | 0.85 $\pm$ 0.01 (12)*                     |
| N468Q  | 0.62 $\pm$ 0.04 (9)**                         | 0.84 $\pm$ 0.03 (9)*                      | 0.79 $\pm$ 0.01 (9)**                       | 0.79 $\pm$ 0.01 (9)**                     |
| N475Q  | 1.01 $\pm$ 0.01 (3)                           | 1.04 $\pm$ 0.02 (3)                       | 1.04 $\pm$ 0.02 (3)                         | 0.97 $\pm$ 0.02 (3)                       |
| N585Q  | 1.01 $\pm$ 0.02 (3)                           | 0.94 $\pm$ 0.01 (3)                       | 0.94 $\pm$ 0.02 (3)                         | 0.89 $\pm$ 0.01 (3)                       |
| N594Q  | 0.93 $\pm$ 0.01 (3)                           | 0.93 $\pm$ 0.01 (3)                       | 0.94 $\pm$ 0.01 (3)                         | 0.94 $\pm$ 0.02 (3)                       |
| N663Q  | 0.05 $\pm$ 0.01 (3)**                         | 0.51 $\pm$ 0.02 (3)**                     | 0.76 $\pm$ 0.02 (3)*                        | 0.73 $\pm$ 0.03 (3)*                      |
| N769Q  | 1.02 $\pm$ 0.02 (3)                           | 0.94 $\pm$ 0.02 (3)                       | 0.91 $\pm$ 0.01 (3)                         | 0.88 $\pm$ 0.01 (3)                       |
| N812Q  | 0.39 $\pm$ 0.02 (12)**                        | 0.73 $\pm$ 0.04 (12)*                     | 0.85 $\pm$ 0.04 (12)*                       | 0.81 $\pm$ 0.03 (12)*                     |
| N812A  | 0.40 $\pm$ 0.01 (3)**                         | 0.70 $\pm$ 0.01 (3)*                      | 0.77 $\pm$ 0.01 (3)*                        | 0.77 $\pm$ 0.01 (3)*                      |
| N876Q  | 0.98 $\pm$ 0.02 (3)                           | 0.92 $\pm$ 0.01 (3)                       | 0.98 $\pm$ 0.02 (3)                         | 0.96 $\pm$ 0.02 (3)                       |
| N883Q  | 0.96 $\pm$ 0.02 (3)                           | 0.93 $\pm$ 0.01 (3)                       | 0.97 $\pm$ 0.02 (3)                         | 0.95 $\pm$ 0.02 (3)                       |
| N973Q  | 0.76 $\pm$ 0.03 (3)*                          | 0.96 $\pm$ 0.03 (3)                       | 0.89 $\pm$ 0.04 (3)*                        | 0.81 $\pm$ 0.03 (3)*                      |
| N986Q  | 1.01 $\pm$ 0.05 (6)                           | 0.98 $\pm$ 0.04 (6)                       | 1.03 $\pm$ 0.05 (6)                         | 0.94 $\pm$ 0.05 (6)                       |
| N92Q/N184Q   | 0.80 $\pm$ 0.03 (6)*                          | 0.95 $\pm$ 0.01 (6)                       | 0.88 $\pm$ 0.02 (6)*                        | 0.88 $\pm$ 0.01 (6)*                      |
| N92Q/N348Q   | 0.59 $\pm$ 0.02 (6)**                         | 0.80 $\pm$ 0.03 (6)*                      | 0.78 $\pm$ 0.01 (6)*                        | 0.79 $\pm$ 0.02 (6)*                      |
| N92Q/N468Q   | 0.62 $\pm$ 0.05 (6)**                         | 0.84 $\pm$ 0.02 (6)*                      | 0.80 $\pm$ 0.03 (6)*                        | 0.79 $\pm$ 0.05 (6)*                      |
| N92Q/N594Q   | 0.74 $\pm$ 0.02 (3)**                         | 0.82 $\pm$ 0.01 (3)*                      | 0.82 $\pm$ 0.01 (3)*                        | 0.80 $\pm$ 0.01 (3)*                      |
| N92Q/N812Q   | 0.26 $\pm$ 0.01 (3)**                         | 0.54 $\pm$ 0.01 (3)**                     | 0.67 $\pm$ 0.01 (3)**                       | 0.68 $\pm$ 0.01 (3)**                     |
| N136Q/N184Q  | 0.84 $\pm$ 0.02 (3)                           | 0.89 $\pm$ 0.01 (3)                       | 0.91 $\pm$ 0.01 (3)                         | 0.97 $\pm$ 0.01 (3)                       |
| N136Q/N769Q  | 1.13 $\pm$ 0.02 (3)                           | 0.96 $\pm$ 0.01 (3)                       | 0.93 $\pm$ 0.01 (3)                         | 0.92 $\pm$ 0.01 (3)                       |
| N348Q/N468Q  | 0.11 $\pm$ 0.01 (3)**                         | 0.47 $\pm$ 0.01 (3)**                     | 0.65 $\pm$ 0.01 (3)*                        | 0.72 $\pm$ 0.01 (3)*                      |
| N348Q/N812Q  | 0.04 $\pm$ 0.03 (6)**                         | 0.38 $\pm$ 0.01 (6)**                     | 0.55 $\pm$ 0.01 (6)**                       | 0.54 $\pm$ 0.01 (6)**                     |
| N468Q/N812Q  | 0.16 $\pm$ 0.01 (6)**                         | 0.53 $\pm$ 0.01 (6)**                     | 0.69 $\pm$ 0.01 (6)**                       | 0.76 $\pm$ 0.01 (6)**                     |
| N594Q/N876Q  | 0.76 $\pm$ 0.03 (3)*                          | 0.82 $\pm$ 0.02 (3)*                      | 0.82 $\pm$ 0.01 (3)*                        | 0.82 $\pm$ 0.02 (3)*                      |
| N348Q/N468Q/N812Q  | 0.04 $\pm$ 0.03 (3)**                         | 0.39 $\pm$ 0.01 (3)**                     | 0.72 $\pm$ 0.01 (3)**                       | 0.74 $\pm$ 0.01 (3)**                     |

## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

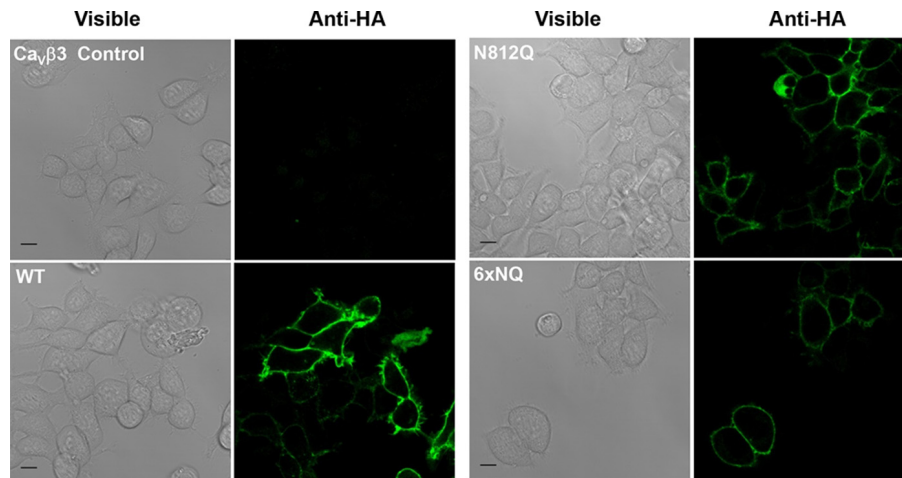
**TABLE 2**

**Biophysical properties of Ca<sub>v</sub>1.2/Ca<sub>v</sub>β3 with Ca<sub>v</sub>α2δ1 WT and mutants**

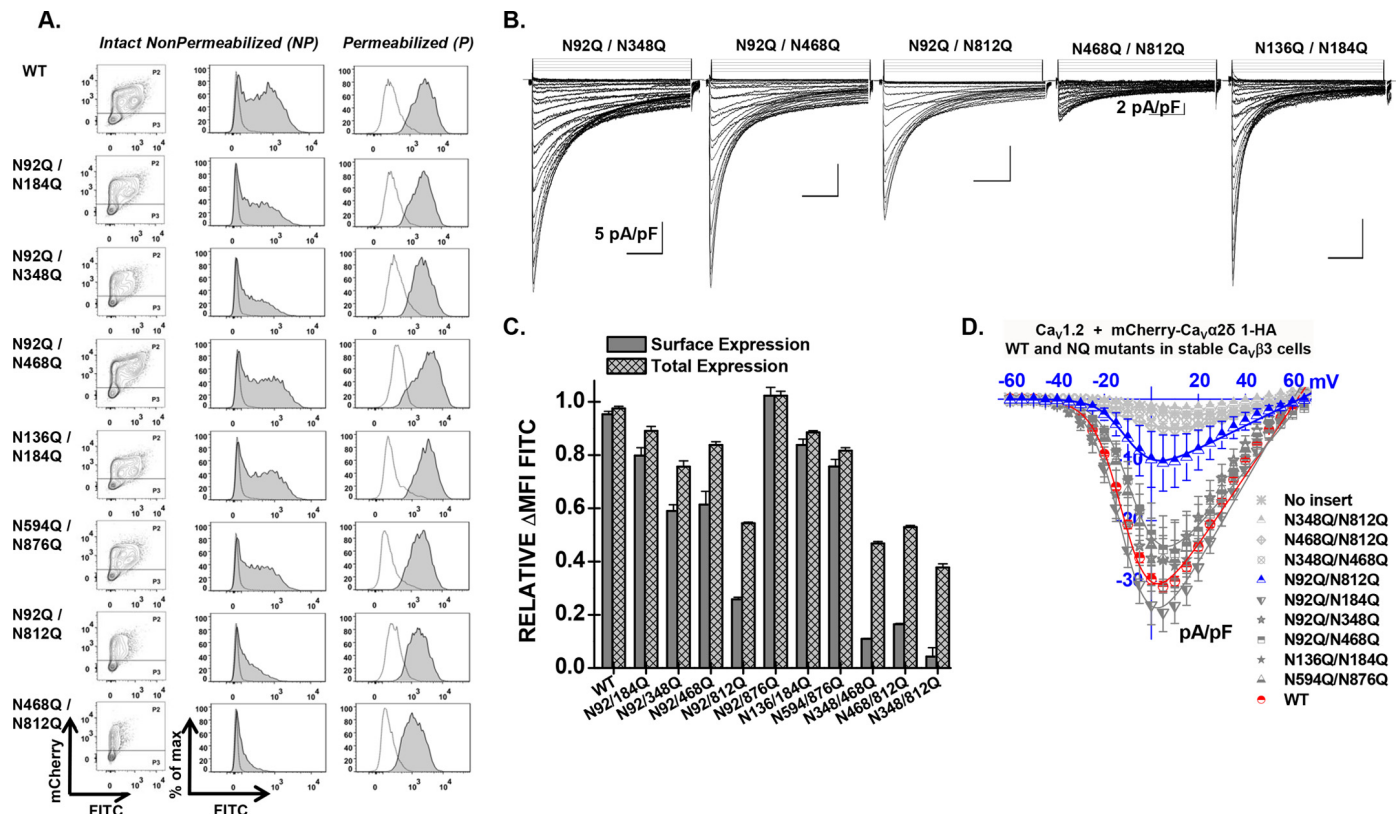
Ca<sub>v</sub>1.2 WT was co-expressed in stable Ca<sub>v</sub>β3 cells with pmCherry-no insert or pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or mutant using a 1:1 DNA ratio. Biophysical parameters were measured in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> as described elsewhere (17, 22). Activation properties ( $E_{0.5,act}$  and  $\Delta G_{act}$ ) were estimated from the mean *I*-*V* relationships and fitted to a Boltzmann equation. The data are shown with the mean  $\pm$  S.E. of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses. N.D. not determined because of a poor signal to noise ratio. Statistical analysis was carried out against the values obtained in the presence of mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT (\* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01).

| mCherry-Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA WT or mutant with Ca <sub>v</sub> 1.2 WT in stable Ca <sub>v</sub> β3 cells with 2 mM Ca <sup>2+</sup> | BIOPHYSICAL PROPERTIES       |                    |  |                    |
|--|------------------------------|--------------------|--|--------------------|
|  | Peak current density (pA/pF) | $E_{0.5,act}$ (mV) | $\Delta G_{act}$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) | r100 at +5 mV      |
| empty mCherry vector   | -2.6 ± 0.4 (35)**            | +8 ± 2 (35)**      | +0.5 ± 0.1 (35)**                          | N.D.               |
| mCherry-Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA WT   | -30 ± 1 (231)                | -9.6 ± 0.1 (231)   | -0.86 ± 0.02 (231)                         | 0.38 ± 0.02 (231)  |
| N92Q   | -20 ± 3 (8)                  | -6.9 ± 0.6 (8)     | -0.61 ± 0.06 (8)                           | 0.26 ± 0.02 (8)    |
| N136Q  | -24 ± 6 (8)                  | -10 ± 1 (8)        | -0.9 ± 0.1 (8)                             | 0.26 ± 0.03 (8)    |
| N184Q  | -24 ± 5 (8)                  | -9 ± 1 (8)         | -1.0 ± 0.3 (8)                             | 0.32 ± 0.04 (8)    |
| N324Q  | -27 ± 5 (11)                 | -9 ± 1 (11)        | -0.9 ± 0.3 (11)                            | 0.30 ± 0.03 (11)   |
| N348Q  | -16 ± 3 (18)*                | -5 ± 1 (18)*       | -0.4 ± 0.1 (18)                            | 0.42 ± 0.03 (18)   |
| N468Q  | -21 ± 1 (55)*                | -5 ± 1 (55)*       | -0.4 ± 0.1 (55)                            | 0.37 ± 0.02 (55)   |
| N585Q  | -19 ± 4 (9)*                 | -10.5 ± 0.8 (9)    | -1.5 ± 0.5 (9)                             | 0.30 ± 0.02 (9)    |
| N594Q  | -34 ± 5 (8)                  | -10.3 ± 0.8 (8)    | -0.97 ± 0.09 (8)                           | 0.24 ± 0.02 (8)    |
| N663Q  | -5 ± 2 (28)**                | +3 ± 2 (28)**      | +0.1 ± 0.1 (28)**                          | N.D.               |
| N769Q  | -32 ± 6 (8)                  | -10 ± 1 (8)        | -1.0 ± 0.2 (8)                             | 0.32 ± 0.03 (8)    |
| N812Q  | -9 ± 2 (30)**                | -2 ± 1 (30)**      | -0.3 ± 0.1 (30)**                          | 0.44 ± 0.03 (30)** |
| N876Q  | -38 ± 11 (10)                | -11 ± 2 (10)       | -1.1 ± 0.2 (10)                            | 0.27 ± 0.03 (10)   |
| N986Q  | -30 ± 10 (12)                | -9 ± 1 (12)        | -0.9 ± 0.2 (12)                            | 0.31 ± 0.03 (12)   |
| N92Q/N184Q   | -18 ± 4 (10)                 | -7 ± 1 (10)        | -0.6 ± 0.1 (10)                            | 0.34 ± 0.02 (10)   |
| N92Q/N348Q   | -11 ± 3 (7)**                | -7 ± 1 (7)         | -0.53 ± 0.07 (7)                           | 0.36 ± 0.03 (7)    |
| N92Q/N468Q   | -13 ± 3 (9)*                 | -6.1 ± 0.8 (9)     | -0.53 ± 0.08 (9)                           | 0.45 ± 0.03 (9)*   |
| N92Q/N594Q   | -31 ± 6 (10)                 | -10 ± 1 (10)       | -1.1 ± 0.2 (10)                            | 0.32 ± 0.03 (10)   |
| N92Q/N812Q   | -10 ± 5 (8)**                | -3 ± 2 (8)**       | -0.4 ± 0.1 (8)                             | 0.39 ± 0.03 (8)    |
| N92Q/N876Q   | -22 ± 3 (9)                  | -6 ± 1 (9)         | -0.9 ± 0.3 (9)                             | 0.36 ± 0.03 (9)    |
| N136Q/N184Q  | -25 ± 5 (17)                 | -7 ± 1 (17)        | -0.5 ± 0.1 (17)                            | 0.32 ± 0.05 (17)   |
| N136Q/N769Q  | -27 ± 4 (10)                 | -7 ± 2 (10)        | -0.6 ± 0.2 (10)                            | 0.33 ± 0.04 (10)   |
| N348Q/N468Q  | -4 ± 1 (5)**                 | +2 ± 3 (5)**       | +0.1 ± 0.1 (5)**                           | 0.56 ± 0.03 (5)**  |
| N348Q/N812Q  | -1.9 ± 0.4 (17)**            | +8 ± 2 (17)**      | +0.3 ± 0.1 (17)**                          | 0.48 ± 0.08 (17)** |
| N468Q/N812Q  | -3.1 ± 0.9 (6)**             | -2 ± 2 (6)*        | -0.1 ± 0.1 (6)**                           | 0.44 ± 0.04 (6)**  |
| N594Q/N876Q  | -26 ± 6 (10)                 | -6 ± 1 (10)        | -0.6 ± 0.1 (10)                            | 0.31 ± 0.02 (10)   |
| N585Q/N769Q/N883Q  | -30 ± 4 (8)                  | -10 ± 1 (8)        | -1.0 ± 0.2 (8)                             | 0.30 ± 0.03 (8)    |
| N92Q/N348Q/N594Q/N876Q   | -29 ± 5 (10)                 | -11 ± 1 (10)       | -1.0 ± 0.1 (10)                            | 0.34 ± 0.02 (10)   |
| N585Q/N769Q/N883Q/N1066Q   | -35 ± 8 (10)                 | -10.8 ± 0.4 (10)   | -1.1 ± 0.1 (10)                            | 0.28 ± 0.04 (10)   |
| N92Q/N184Q/N468Q/N876Q/N986Q   | -19 ± 3 (25)*                | -6.6 ± 0.7 (25)    | -0.63 ± 0.08 (25)                          | 0.32 ± 0.03 (25)   |
| N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q (6xNQ)  | -5 ± 1 (8)**                 | +1 ± 2 (8)**       | -0.2 ± 0.7 (8)**                           | 0.41 ± 0.02 (8)*   |
| N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q (6xNQ+Q92N)  | -8 ± 2 (10)**                | -2 ± 1 (10)**      | -0.4 ± 0.1 (10)**                          | 0.36 ± 0.01 (10)*  |
| N92Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q (6xNQ+Q184N)  | -8 ± 2 (10)**                | -3 ± 2 (10)**      | -0.6 ± 0.1 (10)**                          | 0.36 ± 0.02 (10)   |
| N92Q/N184Q/N594Q/N812Q/N876Q (6xNQ+Q348N)  | -10 ± 4 (17)**               | -2 ± 2 (17)**      | -0.6 ± 0.8 (17)**                          | 0.38 ± 0.02 (17)   |
| N92Q/N184Q/N348Q/N812Q/N876Q (6xNQ+Q594N)  | -5 ± 2 (10)**                | -3 ± 2 (10)**      | -0.5 ± 0.1 (10)**                          | 0.30 ± 0.01 (10)   |
| N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N876Q (6xNQ + Q812N)  | -12 ± 2 (19)**               | -5.1 ± 0.7 (19)**  | -0.41 ± 0.05 (19)**                        | 0.37 ± 0.01 (19)   |
| N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q (6xNQ+Q876N)  | -3.7 ± 0.8 (9)**             | +2 ± 2 (9)**       | 0.0 ± 0.1 (9)**                            | 0.48 ± 0.02 (9)    |
| N92Q/N184Q/N468Q/N594Q/N876Q/N986Q (6xNQ alt1)   | -26 ± 5 (13)                 | -6 ± 1 (13)        | -0.6 ± 0.1 (13)                            | 0.3 ± 0.1 (13)     |
| N92Q/N136Q/N184Q/N348Q/ N468Q/ N585Q/N594Q/N663Q/ N769Q/ N812Q/ N876Q/N883Q/ N986Q/N1066Q (14xNQ)                                      | -1.2 ± 0.2 (5)**             | +11 ± 8 (5)**      | +0.4 ± 0.3 (5)**                           | N.D.               |

## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex



**FIGURE 6. Live cell imaging of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins WT and mutants.**  $\text{Ca}_v\beta 3$  stable HEK293 cells were transfected with pCMV- $\text{Ca}_v 1.2$  and pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT, N812Q, or 6xNQ (N92Q/N184Q/N348Q/N594Q/N812Q/N876Q). One day after transfection, live cells were incubated with the FITC-conjugated anti-HA antibody (1:100) and the nuclei were stained with DAPI (1:1000) (data not shown) in  $1 \times \text{PBS}$  for 45 min at  $4^\circ\text{C}$ . Confocal fluorescent images were captured with a Zeiss LSM 710 confocal microscope system with  $\times 63/1.40$  oil objective. Scale bar corresponds to  $10\ \mu\text{m}$ . The immunofluorescent signals from the FITC-conjugated anti-HA antibody (green) are shown to the right of the corresponding differential interference contrast images. Under these conditions, the FITC signal was mostly restricted to the cell surface of intact cells. No signal was observed in nontransfected cells (upper left quadrant) or in the absence of primary or conjugated antibody (data not shown).

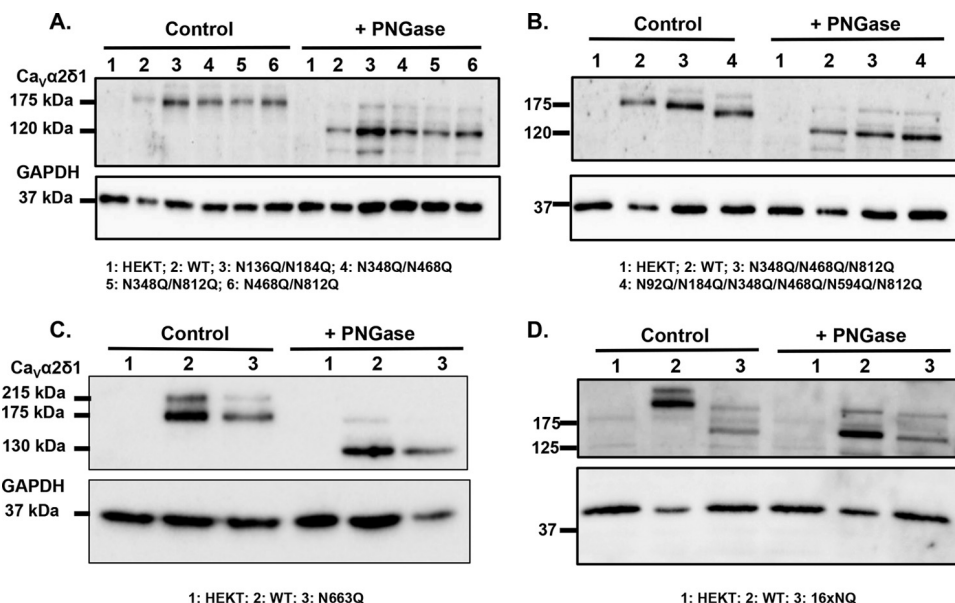


**FIGURE 7. Combining mutations N346Q, N468Q, and N812Q eliminates cell surface expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  and modulation of  $\text{Ca}_v 1.2$  whole-cell currents.** *A*, representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence are shown for each mutation as stated. *B*, representative whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  current traces recorded after recombinant expression of  $\text{Ca}_v 1.2$  in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT or some double N-glycosylation mutants. Unless specified otherwise, the current density scale is  $5\ \text{pA/pF}$ . Functional modulation by mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT was measured under the same experimental conditions (data not shown). *C*, bar graph shows the normalized  $\Delta\text{MFI}$  measured in the presence of FITC in intact (surface expression) or permeabilized cells (total expression). In all cases, the  $\Delta\text{MFI}$  fluorescence measured for FITC in permeabilized cells was qualitatively similar to the constitutive fluorescence measured for mCherry validating the accessibility of the HA epitope and confirming the values obtained for total protein expression. *D*, current-voltage relationships, recorded in the presence of  $2\ \text{mM}\ \text{Ca}^{2+}$ , are shown for the double mutations mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q/N184Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q/N348Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q/N468Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N348Q/N812Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N468Q/N812Q, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N594Q/N876Q, and mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N136Q/N184Q. See Tables 1 and 2 for details.

tively. These results confirm that the simultaneous mutation of these Asn sites significantly affected the glycosylation status of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , although the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein remains strongly N-linked glycosylated. Together, these data show that the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein is heavily glycosylated on many if not all of the 16 Asn sites because the simultaneous mutation



## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex



**FIGURE 8. Mutation of all 16 Asn sites appears to eliminate N-glycosylation from  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .** HEKT cells were transiently transfected with pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT and mutants as described. One day after transfection, cells were lysed and protein lysates were either treated with the vehicle buffer (control conditions) or with PNGase F. Proteins were fractionated by SDS-PAGE (8%). Western blot analysis was carried out with the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  antibody (Alomone Labs) as the primary antibody. **A**, lane 1, mock-transfected HEKT cells; lane 2, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT; lane 3, N136Q/N184Q; lane 4, N348Q/N468Q; lane 5, N348Q/N812Q; and lane 6, N468Q/N812Q. Before treatment with PNGase F, the calculated molecular masses for the high density band were as follows: lane 2, 173 kDa; lane 3, 163 kDa; lane 4, 163 kDa; lane 5, 166 kDa; and lane 6, 163 kDa. After digestion with PNGase F: lane 2, 123 kDa; lane 3, 121 kDa; lane 4, 121 kDa; lane 5, 119 kDa; and lane 6, 118 kDa. Lanes 2 ( $\pm$  PNGase) were loaded with 5  $\mu\text{g}$  of proteins and lanes 1; 3–6 ( $\pm$  PNGase) were loaded with 10  $\mu\text{g}$ . **B**, lane 1, mock-transfected HEKT cells; lane 2, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT; lane 3, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N348Q/N468Q/N812Q; and lane 4, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA N92Q/N184Q/N348Q/N468Q/N594Q/N812Q. Before PNGase F treatment, the calculated molecular masses for the high density band were as follows: lane 2, 173 kDa; lane 3, 159 kDa; and lane 4, 144 kDa. After digestion with PNGase F: lane 2, 123 kDa; lane 3, 118 kDa; and lane 4, 116 kDa. Lanes 2 ( $\pm$  PNGase) were loaded with 5  $\mu\text{g}$  of proteins, and lanes 1, 3, and 4 ( $\pm$  PNGase) were loaded with 10  $\mu\text{g}$ . **C**, lane 1, mock-transfected HEKT cells; lane 2, pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT; and lane 3, N663Q. Before PNGase F treatment, the calculated molecular masses for the high density band were as follows: lane 2, 173 kDa; lane 3, 168 kDa. After digestion with PNGase F, the calculated molecular masses for the high density band were as follows: lane 2, 130 kDa; lane 3, 130 kDa. All lanes were loaded with 10  $\mu\text{g}$  of proteins. **D**, lane 1, mock-transfected HEKT cells; lane 2, pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT; and lane 3, 16xNQ. Before PNGase F treatment, the calculated molecular masses for the high density band were as follows: lane 2, 183 kDa; lane 3, 132 kDa. After digestion with PNGase F, the calculated molecular masses for the high density band were as follows: lane 2, 130 kDa; lane 3, 127 kDa. Lanes 2 ( $\pm$  PNGase) were loaded with 10  $\mu\text{g}$  of proteins, and lanes 1 and 3 were loaded with 20  $\mu\text{g}$ . There was a 50-kDa reduction in the mobility of the recombinant  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein after the simultaneous mutation of the 16 Asn sites. Furthermore, enzymatic deglycosylation with PNGase F produced recombinant  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins with the same apparent mobility suggesting that the 16 Asn sites account for the complete N-glycosylated state of the protein.

of the 16 sites eliminated the formation of the glycosylated protein (Fig. 8D).

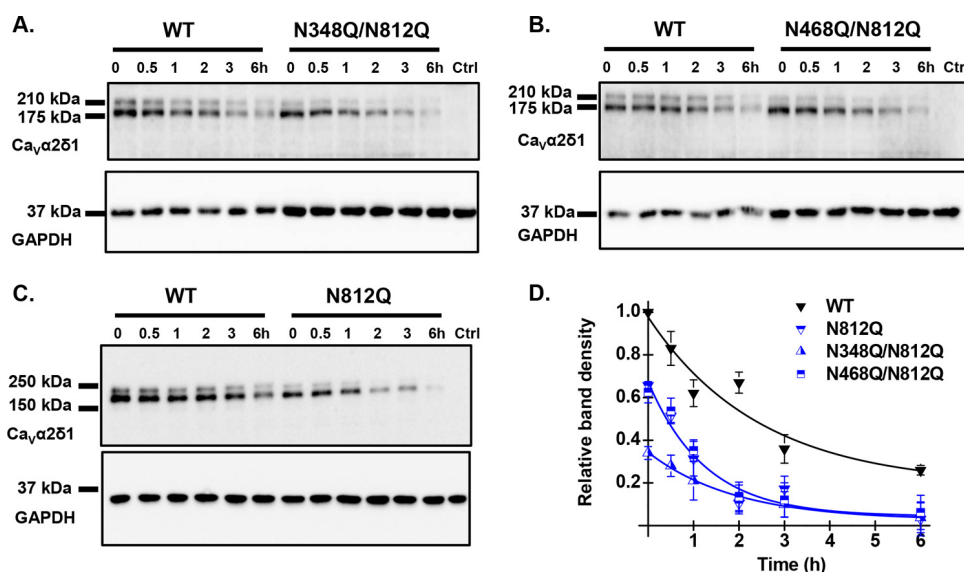
**Protein Stability/Synthesis Was Impaired in Asn Mutants—**The decrease in the cell surface density of the double mutants N348Q/N812Q and N468Q/N812Q was accompanied by a 50–60% decrease in the FITC fluorescence under permeabilized conditions suggesting that protein stability was severely altered. Chase assays were carried out in the presence of cycloheximide (a blocker of *de novo* protein synthesis) to document the time course of protein degradation. Cycloheximide was added 24 h after transfection, and total cell lysates were collected at different time points. Protein density was estimated from Western blots relative to the loading control GAPDH and normalized using the protein density of the WT construct at time 0 (Fig. 9, A–C). In all cases, the major band formed by the mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT construct disappeared with a half-life estimated at  $2.8 \pm 0.5$  h ( $n = 7$ ) (Fig. 9D). As compared with the WT construct, the relative protein density of the double mutants N348Q/N812Q and N468Q/N812Q were significantly lower even at time 0. The degradation kinetics were also slightly faster with  $t_{1/2} \approx 1.2 \pm 0.8$  h ( $n = 2$ ) and  $t_{1/2} = 1.8 \pm 0.5$  h ( $n = 3$ ), respectively. These data suggest that N-glycosylation at these sites is required for protein translation or else that kinetics of degradation of NQ mutants are faster than the kinetics of pro-

tein synthesis, an observation that was also reported for glycosylation-defective mutations of the type 1 transmembrane auxiliary subunit KCNE1 (43).

## Discussion

**16 Asn Sites Account for N-type Glycosylation of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ —**N-Linked glycosylation is one of the most common post-translational modifications known to influence the turnover and the stability of cardiac ion channels (61–65). With the cardiac  $\text{Ca}_v 1.2$  macromolecular complex,  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is the most heavily glycosylated protein (13) with N-glycans increasing the apparent molecular mass by about 50 kDa. The fully glycosylated form was found to be the dominant protein species of the endogenous  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  found in the plasma and associated caveolae membranes of isolated cardiomyocytes. In this work, we have addressed the role of N-glycosylation in the protein density, steady-state cell surface levels, and the function of the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  auxiliary subunit using mobility shift assays, cycloheximide pulse-chase analysis, flow cytometry assays, and patch clamp recordings of recombinant  $\text{Ca}_v 1.2$  currents. The 16 consensus N-type glycosylation sites were characterized after single or multiple mutations of Asn to Gln. By combining fluorescence and functional assays, we demonstrated that multiple glycosylation-defective mutants reduced the steady-state

# N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex



**FIGURE 9. Multiple Asn mutations may impair protein stability.** HEKT cells were transiently transfected with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT and the glycosylation mutants N348Q/N812Q (A), N468Q/N812Q (B), and N812Q (C). Exactly 24 h after transfection, subconfluent cells were incubated with 100 μg/ml cycloheximide. At the indicated time points, cell lysates were prepared and fractionated by SDS-PAGE (8%). Ca<sub>v</sub>α2δ1 and GAPDH proteins were respectively probed with anti-Ca<sub>v</sub>α2δ1 (Alomone Labs) and anti-GAPDH. Please note that we loaded 2× more proteins in the wells for the double mutants to visualize their time course alongside the WT construct. In particular, each lane for Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT was loaded with 5 μg of proteins in A and B, and 10 μg of proteins were loaded for N348Q/N812Q and N468Q/N812Q. C, 10 μg of proteins were loaded for Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT and N812Q. D, protein density was estimated relative to the density of the GAPDH band and normalized to the protein density for the wild-type construct at time 0. Protein band intensities were quantified by densitometry using ImageLab (Bio-Rad) software at a single exposure selected for clear bands without saturation. Averaged data points were fitted with a mono-exponential decay function. The half-life was  $t_{1/2} = 2.8 \pm 0.5$  h ( $n = 7$ ) for pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT;  $t_{1/2} = 1.2 \pm 0.8$  h ( $n = 2$ ) for N348Q/N812Q;  $t_{1/2} = 1.8 \pm 0.5$  h ( $n = 3$ ) for N468Q/N812Q; and  $t_{1/2} = 1.9 \pm 0.7$  h ( $n = 3$ ) for N812Q. As seen, the data points for the decay of N812Q and N468Q/N812Q are superimposed with similar relative densities, whereas protein density for N348Q/N812Q was lower at time 0.

cell surface density, decreased total protein density, and diminished protein stability of Ca<sub>v</sub>α2δ1. The drop in the cell surface expression of Ca<sub>v</sub>α2δ1 in turn significantly impaired peak current density and activation gating of the L-type Ca<sub>v</sub>1.2 channel.

Enzymatic digestion with PNGase F of the native and recombinant Ca<sub>v</sub>α2δ1 reduced by 50 kDa the electrophoretic mobility of the protein. A similar mobility shift was observed when comparing the migration profile of the WT and the 16xNQ construct demonstrating that many if not all the 16 Asn sites are required to account for the N-glycosylated state of the Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein. Interestingly, the recently published three-dimensional structure of the skeletal muscle Ca<sub>v</sub>1.1 channel complex is compatible with the proposition that most 16 N-glycan sites are glycosylated (66). The nature of the carbohydrate chain modifications that the protein undergoes from the endoplasmic reticulum to the post-Golgi compartments was not investigated in this work. We used throughout PNGase F, an amidase that cleaves between the innermost N-acetylglucosamine and Asn residues of high mannose, hybrid, and complex oligosaccharides from N-linked glycoproteins, thus stripping all glycans from the protein. Protein biogenesis further includes trimming of glucose and mannose residues by glycosidases and addition of new residues via glycosyltransferases in the ER and, to a great extent, in the Golgi. In the Golgi, high mannose N-glycans can be converted to a variety of complex and hybrid forms that are unique to each protein (67). The Ca<sub>v</sub>α2δ1 protein thus contains multiple glycosylation sites that may be modified with any of the three classes of N-linked glycans. Adding to the complexity, different units of the same Ca<sub>v</sub>α2δ1 glycoprotein may have different glycan structures attached to the identical Asn site. From the mobility shift assays conducted with the multiple

mutants, it can be argued that many of these 16 sequons are modified by N-glycans even NXS sequons with negatively charged or hydrophobic amino acids at the X-position (such as Asn-136 and Asn-184) that are considered to be poorer substrates for the oligosaccharyltransferase complex (43, 56). The N-glycan modification of many sequons appears to individually contribute 3–5 kDa to Ca<sub>v</sub>α2δ1. Although this is often difficult to detect visually for single mutations, it can be seen more clearly with double mutants.

**Mutation of Asn-663 Prevents Cell Surface Density of Ca<sub>v</sub>α2δ1**—The single mutation of Asn-663 (N663Q) prevented the detection of the protein at the cell surface by immunofluorescence and channel modulation. Asn-663 is located close to the 9-residue HA epitope that was inserted after Asp-676 in the primary structure of Ca<sub>v</sub>α2δ1. However, substitution of the asparagine for the glutamine residue did not prevent protein synthesis as the protein was expressed with the expected molecular mass. Furthermore, the mCherry and the HA epitope of this construction were fluorescently labeled and detected in intact and permeabilized cells, respectively. Every other single Asn mutation within the 16 sites did not significantly affect cell surface density or protein function thus making Asn-663 one of the most critical single sites for protein expression. Asn sites in the 6xNQ mutant prevented protein detection at the surface and impaired modulation of Ca<sub>v</sub>1.2 currents. Double mutations pairing N348Q, N812Q, and/or N468Q were sufficient to prevent the detection of Ca<sub>v</sub>α2δ1 at the cell surface and abolished the subunit-mediated stimulation of Ca<sub>v</sub>1.2 currents. Other double Asn mutations, including the N136Q/N184Q mutant (60), did not affect cell surface density or protein function. One reason for this discrepancy may lie



## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

in the differences in the mode of regulation of  $\text{Ca}_v1.2$  and  $\text{Ca}_v2.2$  channels by  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . To limit the number of double mutants to be tested (120 possible double mutants for 16 sequons), our strategy was to produce and characterize multiple mutants that impacted on channel function. Multiple mutants produced with either N348Q, N468Q, or N812Q showed a significant decrease in cell surface density and protein function, whereas every single mutation pairing N663Q was not functional. It is impossible to know at this time whether *N*-glycans at these sites interact with each other or with the pore-forming subunit. Current algorithms and the recent three-dimensional structure of the skeletal  $\text{Ca}_v1.1$  channel complex (66) are identifying important structural domains but are not predicting the spatial orientation of the 16 *N*-glycans with each other and other proteins in the channel.

**Protein Stability Was Decreased in Glycosylation-defective Mutants of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$** —The molecular and cellular pathways responsible for the compromised steady-state cell surface expression of the glycosylation-defective  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  proteins remain to be fully elucidated. The decreased surface levels could result from impaired translational rate (68, 69), ER folding yield, trans-Golgi cargo sorting, increased degradation, and/or a combination of these processes. The relative contribution of lectin chaperones, such as calnexin and calreticulin, to protein biogenesis and the nature of the key enzymes responsible for degradation within the ubiquitin-proteasome system of ERAD (68, 70–72) also remain to be identified. Outstanding issues include the identification of the quality control networks that are affected by these specific glycosylation sites (73, 74) and the potential cross-talk between ERAD and autophagy, the two major cellular degradative pathways (75). Finally, there is always the question of overexpressing cardiac proteins in a model cell to study translation events. These are important questions that currently go beyond the scope of this work. Protein assays herein reported nonetheless support the view that protein stability and/or protein synthesis was impaired in Asn mutants suggesting that *N*-glycosylation is a co-translational event (43). The observation that partially glycosylated forms of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  were notably absent from whole-cell homogenates prepared with recombinant cells as well as isolated cardiomyocytes further argues for this scenario.

**L-type Channel Modulation by  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$** —Up-regulation of L-type currents requires robust cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  in cardiomyocytes (19) and in HEKT cells (22). Alterations in the cell surface density of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  caused by mutating glycosylation sites (our study), arrhythmogenic mutations (22), mutations within the “von Willebrand factor” structural domain (76, 77), or following pharmacological modulation (e.g. gabapentin) (76, 78, 79) were shown to decrease channel function by altering the surface levels of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  (76, 77). With the exception of the so-called R-domain (80), these manipulations altered the function of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  (and by extension the function of voltage-gated currents) through a decrease in the membrane expression of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . By analogy with other type 1 transmembrane regulatory subunits of voltage-gated ion channels,  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  could interact with the pore-forming subunit either within the membrane through the voltage sensing domain (as KCNE with Kv7/KCNQ1 channel (81)) and/or from the exter-

nal portion of the protein by interacting with the external pore domain (77). The optimal ratio for channel modulation remains to be established. By comparison, a single high affinity intracellular binding site for  $\text{Ca}_v\beta$  onto the I-II linker of the  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit from high voltage-activated  $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$  channels has been identified (17, 46, 82–84). Whether a single  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  subunit could interact with two  $\text{Ca}_v\alpha1$  or whether the L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channel complex (85) can accommodate two or more  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  subunits remains a question for debate. Nonetheless, mutations affecting the expression of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  is likely to influence  $\text{Ca}^{2+}$  balance in cardiomyocytes (86–88) as in arterial smooth muscle cells (4) by virtue of controlling the activity of L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels (22).

Recent technical advances in glycoprotein crystallography suggest that the more mobile *N*-glycans on cell surface receptors could guide the partner ligand to its binding site and prevent irregular protein aggregation by covering oligomerization sites away from the ligand-binding site (91). Beyond their role in protein biogenesis and/or stability (37), *N*-linked glycans promote interactions with cell adhesion proteins and signaling molecules (40, 89) as it is widely understood for members of the integrin family (90). Glycans could also contribute to channel modulation by altering the surface potential sensed by the gating machinery (92) and/or by modifying conformational changes regulating cooperative subunit interactions during channel activation (93). The Asn-812 site is a choice candidate for such a mechanism. The N812Q mutant was expressed at the cell surface to the same extent as 4xNQ mutant, yet it caused a more extensive decrease in channel function. It can be speculated that *N*-glycans at the Asn-812 site contribute to the functional interaction with the pore-forming subunit of the  $\text{Ca}_v1.2$  channel, either through direct protein-protein interaction and/or by promoting a favorable gating conformation (31). Most structural models predict that the extracellular domain is quite disordered, making it impossible to predict the relative orientation and/or interaction of each *N*-glycan chain within the  $\text{Ca}_v1.2$  channel complex. The nature of the protein-protein interaction (either direct or through a secondary partner), the sites responsible for this interaction, and well as the affinity of the interaction will await further structural characterization of the cardiac  $\text{Ca}_v1.2$  channels. At this time, three-dimensional structures of the purified cardiac  $\text{Ca}_v1.2$  channel complex position the extracellular portion of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  on top of the channel complex at a resolution that prevents identifying interaction domains (32), although the recent three-dimensional structure of the skeletal muscle  $\text{Ca}_v1.1$  channel complex suggests that the VWA domain in  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  may be directly interacting with the voltage-sensing region of the pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit (66). Nonetheless, it is becoming quite evident that biological networks exploit cell-surface glycans to coordinate membrane protein complexes (94). Defects in the glycosylation of type I transmembrane auxiliary subunit  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  could hence trigger ventricular and atrial arrhythmias (22, 95) by decreasing the fraction of functional L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels. Hence, elucidating the cellular processes controlled by glycosylation contributes to furthering our understanding of most biological systems and, in particular, voltage-gated cardiac ion channels.

## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

**Author Contributions**—M. P. T. produced the single and multiple Asn mutants, performed and analyzed the vast majority of the flow cytometry experiments, carried out the cycloheximide chase assays, and stained the HEKT cells for confocal microscopy. B. B. isolated the mouse cardiomyocytes, conducted patch clamp experiments, isolated the sarcolemmal membrane fractions from mouse cardiomyocytes and the plasma membrane fraction from recombinant HEKT cells, as well as carried out the Western blots in Fig. 1B and Fig. 2A. J. B. produced some constructs, and performed the experiments shown in Fig. 2C. E. S. conducted flow cytometry and patch clamp experiments for a few mutants. S. L. supervised the analysis of the flow cytometry experiments. C. F. supervised the isolation and the culture of the mouse cardiomyocytes. L. P. designed and coordinated the study, interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of this manuscript.

**Acknowledgments**—We thank Serge Sénéchal and Dr. Jacques Thibodeau for sharing their expertise and for granting us access to their flow cytometry and cell sorting platform; Behzad Shakeri and Dr. Guillaume Roussel for contribution to patch clamp recordings; Louis Villeneuve for invaluable assistance in confocal microscopy; Nathalie Ethier for help in isolating adult mouse hearts; Julie Verner for superb training in cell culture methods; and Dr. Rémy Sauvé for critical reading of the manuscript.

### References

- Richard, S., Perrier, E., Fauconner, J., Perrier, R., Pereira, L., G  mez, A. M., and B  nitah, J. P. (2006) Calcium-induced calcium entry or how the L-type calcium channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **90**, 118–135
- Bers, D. M. (2000) Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ. Res.* **87**, 275–281
- Kamp, T. J., and Hell, J. W. (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ. Res.* **87**, 1095–1102
- Bannister, J. P., Bulley, S., Narayanan, D., Thomas-Gatewood, C., Luzny, P., Pachuaau, J., and Jaggar, J. H. (2012) Transcriptional upregulation of  $\alpha 2\delta 1$  elevates arterial smooth muscle cell voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel surface expression and cerebrovascular constriction in genetic hypertension. *Hypertension* **60**, 1006–1015
- Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z., and Nattel, S. (1997) Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.* **81**, 512–525
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., Lamorgese, M., Rossie, S. S., McCarthy, P. M., and Nerbonne, J. M. (1999) Atrial L-type calcium currents and human atrial fibrillation. *Circ. Res.* **85**, 428–436
- Aschar-Sobbi, R., Izaddoustdar, F., Korogiy, A. S., Wang, Q., Farman, G. P., Yang, F., Yang, W., Dorian, D., Simpson, J. A., Tuomi, J. M., Jones, D. L., Nanthakumar, K., Cox, B., Wehrens, X. H., Dorian, P., and Backx, P. H. (2015) Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNF $\alpha$ . *Nat. Commun.* **6**, 6018
- Lugenbiel, P., Wenz, F., Govorov, K., Schweizer, P. A., Katus, H. A., and Thomas, D. (2015) Atrial fibrillation complicated by heart failure induces distinct remodeling of calcium cycling proteins. *PLoS ONE* **10**, e0116395
- Richard, S., Leclercq, F., Lemaire, S., Piot, C., and Nargeot, J. (1998) Calcium currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **37**, 300–311
- Mukherjee, R., and Spinale, F. G. (1998) L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 1899–1916
- Catterall, W. A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521–555
- Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., and Yue, D. T. (1999) Calmodulin is the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* **22**, 549–558
- Dolphin, A. C. (2009) Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 237–244
- Dai, S., Hall, D. D., and Hell, J. W. (2009) Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **89**, 411–452
- Gao, T., Puri, T. S., Gerhardstein, B. L., Chien, A. J., Green, R. D., and Hosey, M. M. (1997) Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 19401–19407
- Carl, S. L., Felix, K., Caswell, A. H., Brandt, N. R., Ball, W. J., Jr., Vaghy, P. L., Meissner, G., and Ferguson, D. G. (1995) Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J. Cell Biol.* **129**, 673–682
- Bourdin, B., Marger, F., Wall-Lacelle, S., Schneider, T., Klein, H., Sauvé, R., and Parent, L. (2010) Molecular determinants of the Cav $\beta$ -induced plasma membrane targeting of the Cav1.2 channel. *J. Biol. Chem.* **285**, 22853–22863
- Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., Tedford, H. W., Hermosilla, T., and Zamponi, G. W. (2011) The Cav $\beta$  subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat. Neurosci.* **14**, 173–180
- Fuller-Bicer, G. A., Varadi, G., Koch, S. E., Ishii, M., Bodi, I., Kadeer, N., Muth, J. N., Mikala, G., Petrashevskaya, N. N., Jordan, M. A., Zhang, S. P., Qin, N., Flores, C. M., Isaacsohn, I., Varadi, M., et al. (2009) Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha 2\delta 1$  subunit. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H117–H124
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Dascal, N. (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* **253**, 1553–1557
- Parent, L., Schneider, T., Moore, C. P., and Talwar, D. (1997) Subunit regulation of the human brain  $\alpha_{1E}$  calcium channel. *J. Membr. Biol.* **160**, 127–140
- Bourdin, B., Shakeri, B., Tétreault, M. P., Sauvé, R., Lesage, S., and Parent, L. (2015) Functional characterization of CaVa2d mutations associated with sudden cardiac death. *J. Biol. Chem.* **290**, 2854–2869
- Yasuda, T., Chen, L., Barr, W., McRory, J. E., Lewis, R. J., Adams, D. J., and Zamponi, G. W. (2004) Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 1–13
- Dolphin, A. C. (2013) The  $\alpha 2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1541–1549
- Chang, F. C., and Hosey, M. M. (1988) Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J. Biol. Chem.* **263**, 18929–18937
- Marais, E., Klugbauer, N., and Hofmann, F. (2001) Calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits: structure and gabapentin binding. *Mol. Pharmacol.* **59**, 1243–1248
- Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., and Campbell, K. P. (1991) Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel  $\alpha_2$ -subunit and the associated  $\delta$  peptides. *J. Biol. Chem.* **266**, 3287–3293
- Andrade, A., Sandoval, A., Oviedo, N., De Waard, M., Elias, D., and Felix, R. (2007) Proteolytic cleavage of the voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha 2\delta$  subunit: structural and functional features. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 1705–1710
- Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C. S., Pratt, W. S., and Dolphin, A. C. (2010) The  $\alpha 2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 1654–1659
- Robinson, P., Etheridge, S., Song, L., Shah, R., Fitzgerald, E. M., and Jones, O. T. (2011) Targeting of voltage-gated calcium channel  $\alpha 2\delta$ -1 subunit to lipid rafts is independent from a GPI-anchoring motif. *PLoS ONE* **6**, e19802
- Gurnett, C. A., De Waard, M., and Campbell, K. P. (1996) Dual function of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunit in current stimula-



## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

- tion and subunit interaction. *Neuron* **16**, 431–440
32. Walsh, C. P., Davies, A., Butcher, A. J., Dolphin, A. C., and Kitmitto, A. (2009) Three-dimensional structure of CaV3.1. *J. Biol. Chem.* **284**, 22310–22321
  33. Markkanen, P. M., and Petäjä-Repo, U. E. (2008) N-Glycan-mediated quality control in the endoplasmic reticulum is required for the expression of correctly folded  $\delta$ -opioid receptors at the cell surface. *J. Biol. Chem.* **283**, 29086–29098
  34. Weng, T. Y., Chiu, W. T., Liu, H. S., Cheng, H. C., Shen, M. R., Mount, D. B., and Chou, C. Y. (2013) Glycosylation regulates the function and membrane localization of KCC4. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 1133–1146
  35. Lu, J., Robinson, J. M., Edwards, D., and Deutsch, C. (2001) T1-T1 interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes. *Biochemistry* **40**, 10934–10946
  36. Vacher, H., and Trimmer, J. S. (2012) Trafficking mechanisms underlying neuronal voltage-gated ion channel localization at the axon initial segment. *Epilepsia* **53**, 21–31
  37. Scott, H., and Panin, V. M. (2014) The role of protein N-glycosylation in neural transmission. *Glycobiology* **24**, 407–417
  38. Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., and Molinari, M. (2010) N-Glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 74–82
  39. Ioffe, E., and Stanley, P. (1994) Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 728–732
  40. Dennis, J. W., Nabi, I. R., and Demetriou, M. (2009) Metabolism, cell surface organization, and disease. *Cell* **139**, 1229–1241
  41. Park, K. H., Kwok, S. M., Sharon, C., Baerga, R., Berga, R., and Sesti, F. (2003) N-Glycosylation-dependent block is a novel mechanism for drug-induced cardiac arrhythmia. *FASEB J.* **17**, 2308–2309
  42. Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hördt, M., Towbin, J. A., Borggreffe, M., Assmann, G., Qu, X., Somberg, J. C., Breithardt, G., Oberti, C., and Funke, H. (1997) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat. Genet.* **17**, 267–268
  43. Bas, T., Gao, G. Y., Lvov, A., Chandrasekhar, K. D., Gilmore, R., and Kobertz, W. R. (2011) Post-translational N-glycosylation of type I transmembrane KCNE1 peptides: implications for membrane protein biogenesis and disease. *J. Biol. Chem.* **286**, 28150–28159
  44. Du, D., Yang, H., Norring, S. A., and Bennett, E. S. (2014) *In-silico* modeling of glycosylation modulation dynamics in hERG ion channels and cardiac electrical signals. *IEEE J. Biomed. Health Inform.* **18**, 205–214
  45. Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L., and Perez-Reyes, E. (1993) Cloning and expression of a third calcium channel  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* **268**, 3450–3455
  46. Shakeri, B., Bourdin, B., Demers-Giroux, P. O., Sauvé, R., and Parent, L. (2012) A quartet of leucine residues in the guanylate kinase domain of CaV $\beta$  determines the plasma membrane density of the CaV2.3 channel. *J. Biol. Chem.* **287**, 32835–32847
  47. Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (1992) Structure and functional expression of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* **8**, 71–84
  48. Grandy, S. A., Trépanier-Boulay, V., and Fiset, C. (2007) Postnatal development has a marked effect on ventricular repolarization in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2168–H2177
  49. Trépanier-Boulay, V., Lupien, M. A., St-Michel, C., and Fiset, C. (2004) Postnatal development of atrial repolarization in the mouse. *Cardiovasc. Res.* **64**, 84–93
  50. Lizotte, E., Tremblay, A., Allen, B. G., and Fiset, C. (2005) Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Anal. Biochem.* **345**, 47–54
  51. Lee, G. H., Badorff, C., and Knowlton, K. U. (2000) Dissociation of sarcoglycans and the dystrophin carboxyl terminus from the sarcolemma in enteroviral cardiomyopathy. *Circ. Res.* **87**, 489–495
  52. Clark, R. B., Tremblay, A., Melnyk, P., Allen, B. G., Giles, W. R., and Fiset, C. (2001) T-tubule localization of the inward-rectifier K(+) channel in mouse ventricular myocytes: a role in K<sup>+</sup> accumulation. *J. Physiol.* **537**, 979–992
  53. Wall-Lacelle, S., Hossain, M. I., Sauvé, R., Blunck, R., and Parent, L. (2011) Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in IIS4-S5 linker for the activation of the Cav2.3 calcium channel. *J. Biol. Chem.* **286**, 27197–27205
  54. Yifrach, O., and MacKinnon, R. (2002) Energetics of pore opening in a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Cell* **111**, 231–239
  55. Stanley, P., Schachter, H., and Taniguchi, N. (2009) in *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., and Etzler, M. E., eds) 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
  56. Kasturi, L., Chen, H., and Shakin-Eshleman, S. H. (1997) Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem. J.* **323**, 415–419
  57. Douglas, L., Davies, A., Wratten, J., and Dolphin, A. C. (2006) Do voltage-gated calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunits require proteolytic processing into  $\alpha_2$  and  $\delta$  to be functional? *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 894–898
  58. Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Tran Van Minh, A., Foucault, I., Koch, D., Pratt, W. S., Saibil, H. R., and Dolphin, A. C. (2006) The calcium channel  $\alpha_2\delta_2$  subunit partitions with Cav2.1 into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function. *J. Neurosci.* **26**, 8748–8757
  59. Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633–1649
  60. Sandoval, A., Oviedo, N., Andrade, A., and Felix, R. (2004) Glycosylation of asparagines 136 and 184 is necessary for the  $\alpha_2\delta$  subunit-mediated regulation of voltage-gated calcium channels. *FEBS Lett.* **576**, 21–26
  61. Petrecca, K., Atanasiu, R., Akhavan, A., and Shrier, A. (1999) N-Linked glycosylation sites determine HERG channel surface membrane expression. *J. Physiol.* **515**, 41–48
  62. Gong, Q., Anderson, C. L., January, C. T., and Zhou, Z. (2002) Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H77–H84
  63. Cohen, S. A., and Levitt, L. K. (1993) Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies. *Circ. Res.* **73**, 735–742
  64. Laedermann, C. J., Syam, N., Pertin, M., Decosterd, I., and Abriel, H. (2013)  $\beta_1$ - and  $\beta_3$ -voltage-gated sodium channel subunits modulate cell surface expression and glycosylation of Nav1.7 in HEK293 cells. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 137
  65. Mercier, A., Clément, R., Harnois, T., Bourmeyster, N., Bois, P., and Chatelier, A. (2015) Nav1.5 channels can reach the plasma membrane through distinct N-glycosylation states. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 1215–1223
  66. Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., and Yan, N. (2015) Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* **350**, 10.1126/science.aad2395
  67. Freeze, H. H., and Kranz, C. (2010) Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 12, Unit 12.4
  68. Glozman, R., Okiyoned, T., Mulvihill, C. M., Rini, J. M., Barriere, H., and Lukacs, G. L. (2009) N-Glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic. *J. Cell Biol.* **184**, 847–862
  69. Muthusamy, S., Malhotra, P., Hosameddin, M., Dudeja, A. K., Borthakur, S., Saksena, S., Gill, R. K., Dudeja, P. K., and Alrefai, W. A. (2015) N-Glycosylation is essential for ileal ASBT function and protection against proteases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **308**, C964–C971
  70. Rougier, J. S., Albesa, M., Syam, N., Halet, G., Abriel, H., and Viard, P. (2015) Ubiquitin-specific protease USP2–45 acts as a molecular switch to promote  $\alpha_2\delta_1$ -induced downregulation of Cav1.2 channels. *Pflugers Arch.* **467**, 1919–1929
  71. Suzuki, S., Shuto, T., Sato, T., Kaneko, M., Takada, T., Suico, M. A., Cyr, D. M., Suzuki, H., and Kai, H. (2014) Inhibition of post-translational N-glycosylation by HRD1 that controls the fate of ABCG5/8 transporter. *Sci. Rep.* **4**, 4258



## N-Glycosylation of the Cardiac L-type Channel Complex

72. Comyn, S. A., Chan, G. T., and Mayor, T. (2014) False start: cotranslational protein ubiquitination and cytosolic protein quality control. *J. Proteomics* **100**, 92–101
73. Winchester, B. (2005) Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* **15**, 1R–15R
74. Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Toyoda, Y., Koshiba, S., and Ishikawa, T. (2009) Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS J.* **276**, 7237–7252
75. Hebert, D. N., and Molinari, M. (2012) Flagging and docking: dual roles for N-glycans in protein quality control and cellular proteostasis. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 404–410
76. Cassidy, J. S., Ferron, L., Kadurin, I., Pratt, W. S., and Dolphin, A. C. (2014) Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary  $\alpha 2\delta 1$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 8979–8984
77. Cantí, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Heblich, F., Wratten, J., Richards, M. W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K. M., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of  $\alpha 2\delta$  subunits is key to trafficking voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 11230–11235
78. Gee, N. S., Brown, J. P., Dissanayake, V. U., Offord, J., Thurlow, R., and Woodruff, G. N. (1996) The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the  $\alpha 2\delta$  subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.* **271**, 5768–5776
79. Hendrich, J., Van Minh, A. T., Heblich, F., Nieto-Rostro, M., Watschinger, K., Striessnig, J., Wratten, J., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2008) Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the  $\alpha 2\delta$  ligand gabapentin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3628–3633
80. Song, L., Espinoza-Fuenzalida, I. A., Etheridge, S., Jones, O. T., and Fitzgerald, E. M. (2015) The R-domain: identification of an N-terminal region of the  $\alpha 2\delta 1$  subunit which is necessary and sufficient for its effects on Cav2.2 calcium currents. *Curr. Mol. Pharmacol.* **8**, 169–179
81. Ruscic, K. J., Miceli, F., Villalba-Galea, C. A., Dai, H., Mishina, Y., Bezanilla, F., and Goldstein, S. A. (2013) IKs channels open slowly because KCNE1 accessory subunits slow the movement of S4 voltage sensors in KCNQ1 pore-forming subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E559–E566
82. Berrou, L., Klein, H., Bernatchez, G., and Parent, L. (2002) A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of  $\beta$ -subunit binding and modulation in Cav2.3 calcium channels. *Biophys. J.* **83**, 1429–1442
83. Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Tousignant, A., Dafi, O., Pelletier, J. N., and Parent, L. (2005) The C-terminal residues in the  $\alpha$ -interacting domain (AID) helix anchor Cav  $\beta$  subunit interaction and modulation of Cav2.3 channels. *J. Biol. Chem.* **280**, 494–505
84. Buraei, Z., and Yang, J. (2013) Structure and function of the  $\beta$  subunit of voltage-gated calcium channels. *Biochim. Biophys. Acta.* **1828**, 1530–1540
85. Plant, L. D., Xiong, D., Dai, H., and Goldstein, S. A. (2014) Individual IKs channels at the surface of mammalian cells contain two KCNE1 accessory subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E1438–E1446
86. Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggreffe, M., Häissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G. D., Guerschicoff, A., Laiño, R., Marieb, M., Nademanee, K., Nam, G. B., et al. (2010) Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm.* **7**, 1872–1882
87. Antzelevitch, C., Pollevick, G. D., Cordeiro, J. M., Casis, O., Sanguinetti, M. C., Aizawa, Y., Guerschicoff, A., Pfeiffer, R., Oliva, A., Wollnik, B., Gelber, P., Bonaros, E. P., Jr., Burashnikov, E., Wu, Y., Sargent, J. D., et al. (2007) Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* **115**, 442–449
88. Templin, C., Ghadri, J. R., Rougier, J. S., Baumer, A., Kaplan, V., Albesa, M., Sticht, H., Rauch, A., Puleo, C., Hu, D., Barajas-Martinez, H., Antzelevitch, C., Lüscher, T. F., Abriel, H., and Duru, F. (2011) Identification of a novel loss-of-function calcium channel gene mutation in short QT syndrome (SQTS6). *Eur. Heart J.* **32**, 1077–1088
89. Wormald, M. R., and Dwek, R. A. (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* **7**, R155–R160
90. Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J., and Taniguchi, N. (2008) Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J.* **275**, 1939–1948
91. Nagae, M., and Yamaguchi, Y. (2012) Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8398–8429
92. Pertusa, M., Madrid, R., Morenilla-Palao, C., Belmonte, C., and Viana, F. (2012) N-Glycosylation of TRPM8 ion channels modulates temperature sensitivity of cold thermoreceptor neurons. *J. Biol. Chem.* **287**, 18218–18229
93. Watanabe, I., Wang, H. G., Sutachan, J. J., Zhu, J., Recio-Pinto, E., and Thornhill, W. B. (2003) Glycosylation affects rat Kv1.1 potassium channel gating by a combined surface potential and cooperative subunit interaction mechanism. *J. Physiol.* **550**, 51–66
94. Ohtsubo, K., and Marth, J. D. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **126**, 855–867
95. Brundel, B. J., van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Deelman, L. E., Tieleman, R. G., Grandjean, J. G., van Gilst, W. H., and Crijns, H. J. (1999) Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **42**, 443–454